

DIAGNÓSTICO RÁPIDO PROTEÓMICO (MALDI-TOF MS) PARA LA DETERMINACIÓN DE BACTERIAS RESISTENTES A LOS ANTIBIÓTICOS

Autor/a: Marina Oviaño García

Tesis doctoral UDC / 2016

Director/a: Germán Bou Arévalo

Titor/a: Germán Bou Arevalo

Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud (RD99/2011)¹



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

1

Programa regulado polo RD RD 99/2011: Doctorado de Ciencias de la Salud



El director de esta tesis doctoral, D. Germán Bou Arévalo, Doctor en Ciencias Biológicas, Jefe de Servicio de Microbiología del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC), Director del Área de Microbiología del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y Profesor Asociado de Microbiología de la Universidad de Santiago de Compostela (USC):

CERTIFICA:

Que Dña. Marina Oviaño García, Licenciada en Química por la Universidad de Oviedo, ha realizado en el Servicio de Microbiología y el Instituto de Investigación Biomédica (INIBIC) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña bajo su dirección y tutela, el trabajo **“Diagnóstico rápido proteómico (MALDI-TOF MS) para la determinación de bacterias resistentes a los antibióticos”** el cuál reúne todas las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en A Coruña, a 5 de Diciembre de 2016.

Dr. Germán Bou Arévalo

AGRADECIMIENTOS

Una tesis no es de una persona, es de muchas. Es de esas personas que están todos los días y de las que el azar pone un día en tu camino. Depende de la oportunidad del instante y del trabajo exhaustivo. Es una ecuación de un sinfín de variables. Pero esta página no es para la ciencia. Es para recordarme el camino recorrido y para agradecerlos a vosotros el haber formado parte.

Empiezo por mis años en la facultad dónde todo empezó... Gracias Carmen por acompañarme esos años y los que vendrán. Gracias por explicarme la inorgánica cuando no iba a clase porque la espectrometría de masas me volvía loca... Gracias al Dr. Liz por enseñarme lo más bonito de la química orgánica que es la determinación estructural. Hiciste que me esforzaré más que nunca y creo que al final salió bien... No puedo pensar en una carrera más bonita que la de Química, se me pone una sonrisa en la cara cuando pienso en el universo que se esconde bajo nuestros ojos. Gracias a mis compañeros del Instituto de Química Orgánica del CSIC, Madrid, donde empecé a investigar y a interpretar mis primeros espectros. Deseaba poder dedicarme a la determinación estructural, ver nuevos espectros, analizar el comportamiento de nuevas moléculas... Al final no andaba tan desencaminada.

Después llegué a Coruña... siendo una buena química pero un cero como microbióloga. Gracias a todos los que me enseñasteis todo lo que sé ahora, facultativos, residentes, técnicos, investigadores... Fue un camino difícil, pero espero que hoy estéis orgullosos de lo que he aprendido. Fue un placer haberme formado como especialista en Microbiología en el Hospital de A Coruña. La microbiología ya es también parte de mí. No podría vivir sin este trabajo que me ha dado tanto profesional y personalmente. Cada día es un nuevo reto, una nueva lección, una nueva aventura. No me canso nunca de este trabajo.

Gracias a todos los que habéis colaborado de una u otra forma en las publicaciones que forman esta tesis, María José Barba, Begoña Fernández, José Campos, Jesús Oteo, José Manuel Rodríguez, Álvaro Pascual... Gracias a Marta, por llegar al final y recordarme como era todo al principio. Por aportarme la ilusión del que empieza.

Gracias a la Dr. Katrin Sparbier que me hizo redescubrir todo lo que sabía y ampliar mis horizontes. Me hiciste sentir que no estaba sola en este camino que había elegido. Nunca olvidaré nuestras conversaciones en medio de esa Alemania oscura y nevada. Si alguien sabe de esto...es ella.

Gracias al Dr. Bou por confiar en mi cuando apenas me conocía, por seguir confiando día a día y por darme un proyecto con el que me sentí identificada desde el primer momento y que ha ido creciendo poco a poco hasta llegar hasta aquí. Estoy segura que queda para rato. Gracias por embarcarte en este viaje conmigo.

Gracias a todas esas mujeres científicas que lucharon por tener su hueco en la historia, por hacer algo increíble en un mundo hostil, por ser las madres de todos los que estamos aquí, por abrirnos el camino.

Gracias a mis amigos. Porque les da igual que sea doctora o no...Sois la carcajada justo antes de llorar, es una noche bailando porque no existe mañana, es sidra, risas, conversaciones inagotables...

Gracias a mi familia. Tengo una familia maravillosa, que ha estado apoyándome siempre en todos los momentos, mejores y peores. Siempre dispuestos a todo por mí. Siempre a mi lado, animándome, guiándome, enseñándome tanto...Gracias Juan José, Marcelino y Güela. Os quiero mucho.

Gracias Papá y Mamá, por ser vela, faro y ancla. Por ser los mejores. Por haberme educado con libertad e independencia para tomar mis propias decisiones, respetándolas y apoyándolas. Siempre creísteis que conseguiría todo lo que me propusiera trabajando muy duro, eso he hecho. Me enseñasteis que la vida es una carrera de fondo y siempre hay que seguir adelante. Estoy aquí, sólo gracias a vosotros.

Gracias Nacho, por ser el mejor compañero de vida que se pueda tener. La vida es maravillosa a tu lado. Volvería a casarme contigo todos los días. Me has enseñado tantas cosas, que ni te lo imaginas... Gracias por saber sacar lo mejor de mí. Mi estudio ya no sería nada sin ti al otro lado de la mesa. Somos un equipo perfecto. La vida contigo tiene una imagen con banda sonora.

Te quiero.

Gracias por jugarte la vida conmigo cada día.

En fin, gracias a todos los que habéis participado para que estas páginas sean una realidad.

Esta tesis me sabe a gloria.

Y como decía Antonio Machado,

Caminante, son tus huellas

el camino y nada más;

Caminante, no hay camino,

se hace camino al andar.

Al andar se hace el camino,

y al volver la vista atrás

se ve la senda que nunca

se ha de volver a pisar.

Caminante no hay camino

sino estelas en la mar.

RESUMEN

La espectrometría de masas es una técnica de análisis que permite caracterizar analitos midiendo las relaciones de masas de las moléculas analizadas. La evolución de la tecnología ha permitido llegar al MALDI-TOF MS, que es una variante que permite la detección de mezclas proteicas complejas con mínimas fragmentaciones, lo que permite su aplicación en microbiología en la identificación de microorganismos. Siguiendo con el desarrollo de nuevas aplicaciones de esta tecnología, la detección de moléculas como los antibióticos para la detección de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos es la base de esta tesis. Nos hemos basado en la aplicación de un ensayo de resistencia funcional, basado en la medida de la acción enzimática de la bacteria con mecanismos de resistencia específicos (fundamentalmente β -lactamasas) sobre el antibiótico y el seguimiento de este en el espectro de masas. Los antibióticos estudiados son β -lactámicos, incluyendo carbapenémicos y quinolonas. Hemos conseguido resultados satisfactorios en la aplicación de esta técnica tanto en bacterias aisladas en cultivo como en el hemocultivo. La principal ventaja de esta metodología es la obtención de resultados 24 h antes que los métodos fenotípicos, con bajo coste y con valores de sensibilidad y especificidad similares a los métodos moleculares.

RESUMO

A espectrometría de masas é unha técnica de análise que permite caracterizar analitos medindo as relacións de masas das moléculas analizadas. A evolución da tecnoloxía permitiu chegar ao MALDI-TOF MS, que é unha variante que permite a detección de mesturas proteicas complexas con mínimas fragmentacións, o que permite a súa aplicación en microbioloxía na identificación de microorganismos. Seguindo co desenvolvemento de novas aplicacións desta tecnoloxía, a detección de moléculas como os antibióticos para a detección de mecanismos de resistencia aos antimicrobianos é a base desta tese. Baseámonos na aplicación dun ensaio de resistencia funcional, baseado na medida da acción enzimática da bacteria sobre o antibiótico e o seguimento deste no espectro de masas. Os antibióticos estudados son os β -lactámicos, carbapenémicos e quinolonas. Consequimos resultados satisfactorios na aplicación desta técnica tanto en

bacterias en cultivo como no hemocultivo. A principal vantaxe desta metodoloxía é a obtención de resultados 24 h antes que os métodos fenotípicos, con baixo custo e con valores de sensibilidade e especificidade similares aos métodos moleculares.

ABSTRACT

Mass spectrometry is an analytical technique that allows analytes to be characterized by measuring the mass ratios of the molecules. Evolution of the technology has enabled getting at MALDI-TOF MS, that is variant that allows detection of complex protein mixtures with minimum fragmentations. This leads into its application in microbiology in the identification of microorganisms. Following with the development of new applications of this technology, the basis of this thesis is the detection of molecules as antibiotics for antimicrobial resistance detection. We have based our study on the application of a functional assay that measures the enzymatic activity in the antibiotic and further tracing of the mass spectrum generated. The studied antibiotics were β -lactams, carbapenems and quinolones. We have reached satisfactory results in the application of this technique either in bacterial cultures as in blood cultures. The main advantage of the methodology is the possibility of obtaining results 24 h before than phenotypic methods, with low cost and with sensitivity and specificity values in the range of molecular methods.

Índice

Acrónimos	16
1. Introducción	19
1.1. Aplicación de las técnicas rápidas al diagnóstico clínico y determinación de resistencias	19
1.1.1. Métodos fenotípicos	20
1.1.2. Métodos bioquímicos	21
1.1.3. Métodos moleculares	22
1.2. MALDI-TOF MS: de la teoría a la práctica	27
1.2.1. El MALDI-TOF MS en la identificación y transcendencia clínica	30
1.2.2. Otras aplicaciones del MALDI-TOF MS: epidemiología y serotipado	34
1.3. Resistencia a antibióticos en <i>Enterobacteriaceae</i>	37
1.3.1 Mecanismos de resistencia en <i>Enterobacteriaceae</i>	39
1.3.1.1. Resistencia a β -lactámicos	40
1.3.1.2. Resistencia a carbapenémicos	42
1.3.1.3. Resistencia a quinolonas	44
1.4. El MALDI-TOF MS en la determinación de las resistencias a antibióticos	45
1.4.1. Detección directa de resistencias a través de la actividad enzimática	45
1.4.1.1. Detección de la actividad β -lactamasa	46
1.4.1.2. Detección de la actividad carbapenemasa	47
1.4.1.2. Detección de enzimas modificantes de aminoglucósidos	51
1.4.2. Detección de resistencias a través del perfil proteico bacteriano	51
1.4.2.1. Detección de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	51

1.4.2.2. Detección de <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina	52
1.4.2.3. Detección de <i>Bacteroides fragilis</i> portador del gen <i>cfiA</i>	53
1.4.2.4. Detección directa de β -lactamasas	54
1.4.2.5. Detección de <i>Klebsiella pneumoniae</i> con pérdida de porina OmpK36	55
1.4.3. Detección de la resistencia a través de la medida de los efectos antibióticos ejercidos sobre la bacteria.	55
1.4.3.1. Perfil de resistencia cuantitativo	55
1.4.3.2. Perfiles de resistencia en levaduras	56
2. Objetivos	59
2.1. Objetivo general	59
2.2. Objetivos específicos	60
3. Capítulos	63
3.1. Artículo 1. Detección rápida de Enterobacteriaceae productoras de β -lactamasas de espectro extendido directamente sobre hemocultivos mediante Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	63
3.2. Artículo 2. Detección rápida de Enterobacteriaceae productoras de OXA-48 mediante Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	78
3.3. Artículo 3. Protocolo universal para la detección rápida y automatizada de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas directamente de hemocultivos mediante Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	87
3.4. Artículo 4. Imipenem-avibactam: una nueva combinación para la detección de la actividad carbapenemasas en <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Acinetobacter baumannii</i> a través de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)	95

3.5. Artículo 5. Detección rápida del determinante de resistencia AAC(6')-Ib-cr mediado por plásmidos en <i>Enterobacteriaceae</i> a través de MALDI-TOF MS	114
4. Discusión	143
4.1. Discusión capítulo 1	145
4.2. Discusión capítulo 2	146
4.3. Discusión capítulo 3	147
4.4. Discusión capítulo 4	148
4.5. Discusión capítulo 5	149
5. Conclusiones	151
6. Bibliografía	153

Índice de figuras

Figura 1. Identificación fenotípica de una BLEE mediante disco-difusión.

Figura 2. Identificación bioquímica mediante el Carba NP test de bacterias productoras de carbapenemasas (Hombach M *et al*, JCM, 2015).

Figura 3. Identificación molecular mediante el GenXpert® de una bacteria productora de OXA-48.

Figura 4. Identificación molecular mediante el LightMix® modular Kit de una bacteria productora de OXA-48.

Figura 5. Esquema del proceso de detección mediante MALDI-TOF MS (www.ua-bw.de).

Figura 6. Impacto de la mejora en la base de datos para la identificación de micobacterias no tuberculosas (Rodríguez-Sánchez B *et al*, JCM, 2016).

Figura 7. Dendograma construido mediante MALDI-TOF MS para el tipado de *K. pneumoniae* multirresistente (Berrazeg M *et al*, Plos One, 2013).

Figura 8. Fechas de descubrimiento de las distintas clases de antibióticos (<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>).

Figura 9. Clasificación de las β -lactamasas (Bush K *et al*, AAC, 2010).

Figura 10. Mapa europeo del aumento de la incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (<http://www.eurosurveillance.org/>).

Figura 11. Masas correspondientes a los antibióticos ampicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, meropenem e imipenem y sus correspondientes metabolitos hidrolizados. (Sparbier K *et al*, JCM, 2014)

Figura 12. Porcentaje de hidrólisis de una serie de bacilos Gram negativos en función de su mecanismo de resistencia y de la realización o no de un paso de extracción previo. (Monteferrante CG *et al*, JAC, 2016)

Figura 13. Espectro del Meropenem después de la hidrólisis con una carbapenemasa de tipo VIM-1.

Figura 14. Espectro de *S. aureus* resistente a la meticilina con el gen *mecA* (arriba) con el pico de masa a 2415 Da frente a un *S. aureus* sensible a meticilina.

Figura 15. Espectro de *E. faecium* *VanB* positivo (verde) frente a *VanB* negativo (rojo) (Griffin PM *et al*, JCM, 2012).

Figura 16. Matriz de correlación para diferenciar *B. fragilis* *cfiA* positivos de negativos. (Wybo I. *et al*, JCM, 2011).

Figura 17. Determinación de la resistencia a gentamicina, midiendo el crecimiento relativo de una serie de aislados después de una incubación de 3 h. (Jung J. *et al*, JCM, 2016).

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (Amplificación de fragmentos de polimorfismos)
BLEE	β -lactamasa de espectro extendido
CCI	Composite correlation index (Índice de correlación)
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DHB	Ácido 2,5-hidroxibenzoico
EM	Espectrometría de masas
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico
LC-ESI-TOF	Liquid chromatography-Electrospray Ionization-Time-of-Flight (Cromatografía líquida-Ionization electrospray-Tiempo de vuelo)
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass spectrometry
MLST	Multilocus sequence typing (Tipificación de secuencias multilocus)
MLVA	Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (Análisis repetido de secuencias multilocus variables en número)
MPCC	Minimal Profile Change Concentration (Perfil mínimo para el cambio de concentración)
NGS	Next generation sequencing (Secuenciación de siguiente generación)
PCA	Principal component analysis (Análisis de componentes principales)
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis (Electroforesis en campo pulsado)
PMQR	Plasmid-mediated quinolone resistance (Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos)
PROA	Programa de optimización del uso de antimicrobianos
rep-PCR	Repetitive-sequence-based polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa de secuencias repetidas)
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
SDS	Dodecil sulfato sódico
UFC	Unidades formadoras de colonias
WGS	Whole genome sequencing (Secuenciación del genoma completo)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aplicación de las técnicas rápidas al diagnóstico clínico y determinación de resistencias

La administración de una terapia antibiótica adecuada requiere para la mayor parte de las infecciones, un diagnóstico microbiológico, que consistirá en la identificación del patógeno causante de la infección y su perfil de resistencia [1]. En la práctica clínica, este proceso puede tardar entre 24 y 72 horas, en las cuáles se va aplicar una terapia empírica basada en la sospecha del agente causal y la epidemiología local. El uso de métodos que sean capaces de detectar rápidamente la resistencia antibiótica en aislados bacterianos tiene por tanto el potencial de reducir la duración de la terapia empírica, empleando un antibiótico ya dirigido frente al agente infeccioso. Esto es especialmente importante ya que existen varios estudios que han demostrado que la administración de una terapia antibiótica temprana y adecuada mejora el pronóstico del paciente y que por el contrario el retraso en la administración de una terapia antibiótica adecuada se relaciona con valores más altos de morbilidad y mortalidad [2-6]. Además, el diagnóstico temprano de la resistencia antibiótica contribuye a reducir los costes sanitarios. Varios estudios demuestran que conocer de forma temprana la susceptibilidad antibiótica, da lugar a menores peticiones para pruebas diagnósticas en los laboratorios, una disminución en el número de pruebas invasivas realizadas sobre el paciente y una reducción en la estancia hospitalaria [2-3]. Una ventaja adicional de disponer de un informe de susceptibilidad antibiótica es su potencial para contribuir a los programas de mejora de la administración de antibioterapia [7]. En este contexto, la administración temprana de una adecuada terapia antibiótica con un espectro de actividad lo más estrecho posible para el tratamiento del agente causal puede jugar un papel clave en la reducción del riesgo de transmisión de bacterias resistentes a los antibióticos.

Los métodos empleados más comúnmente son los métodos basados en la detección de la resistencia fenotípica midiendo el crecimiento bacteriano en la presencia de un antibiótico. La ventaja de estos métodos es su sensibilidad, ya que podemos detectar cualquier tipo de resistencia. El inconveniente es que necesitan el crecimiento del patógeno para poder distinguir entre aislados sensibles y resistentes. Los métodos bioquímicos, como el Carba NP test, tienen la ventaja de ser métodos rápidos y fáciles

de realizar. El inconveniente es la interpretación subjetiva de los resultados, la menor sensibilidad con respecto al resto de métodos y la necesidad de tener aislado el microorganismo causal. El desarrollo de los métodos moleculares, ha facilitado la detección temprana de las resistencias antibióticas con gran sensibilidad y especificidad, sin embargo el alto coste de estas técnicas y la necesidad de personal entrenado para realizarlas, las deja al alcance de pocos laboratorios de microbiología clínica. Los métodos proteómicos, con el MALDI-TOF MS a la cabeza, ha demostrado ser un buen método para la determinación de resistencias antibióticas con excelentes valores de sensibilidad y especificidad, siendo además un método rápido y fácil de utilizar. Además el desarrollo de las técnicas es barato, una vez realizado el desembolso inicial en la tecnología. Sin embargo, esta metodología aún se encuentra en una etapa temprana de desarrollo.

A continuación describiré las técnicas más habituales de cada una de estas metodologías de determinación de la resistencia antibiótica.

1.1.1. Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos, como ya hemos comentado anteriormente son los más utilizados. Las técnicas más comunes dentro de estos métodos, son la microdilución en caldo, el disco difusión (fig.1), el método de determinación de la resistencia por gradiente (p. ej. tiras Etest) y los métodos automatizados comerciales (p.ej. MicroScan WalkAway system, Beckman Coulter, Phoenix Automated Microbiology System ,Beckton Dickson y el Vitek, BioMerieux). Además de su gran sensibilidad para detectar la resistencia antibiótica, tiene la ventaja de su aceptada estandarización, una ventaja que otros métodos no poseen. Este proceso se ha facilitado por la elaboración de guías internacionales para la determinación de la susceptibilidad antibiótica, como las publicadas por CLSI y EUCAST [8-9].

Figura 1. Identificación fenotípica de una BLEE mediante disco-difusión.



Para cada uno de estos métodos, existen una gran variedad de proveedores comerciales que proporcionan reactivos en formatos fáciles de utilizar que facilitan su uso en los laboratorios de microbiología clínica con altas cargas asistenciales. Además en el caso de la microdilución y el Etest, se obtiene el valor de la CMI, que proporciona información sobre la cantidad de antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, a pesar de uso extendido y su alta sensibilidad, estos métodos son métodos lentos, que no pueden ser considerados para un diagnóstico rápido, ya que necesitan el crecimiento del microorganismo y en algunos casos también su aislamiento primario de la muestra clínica.

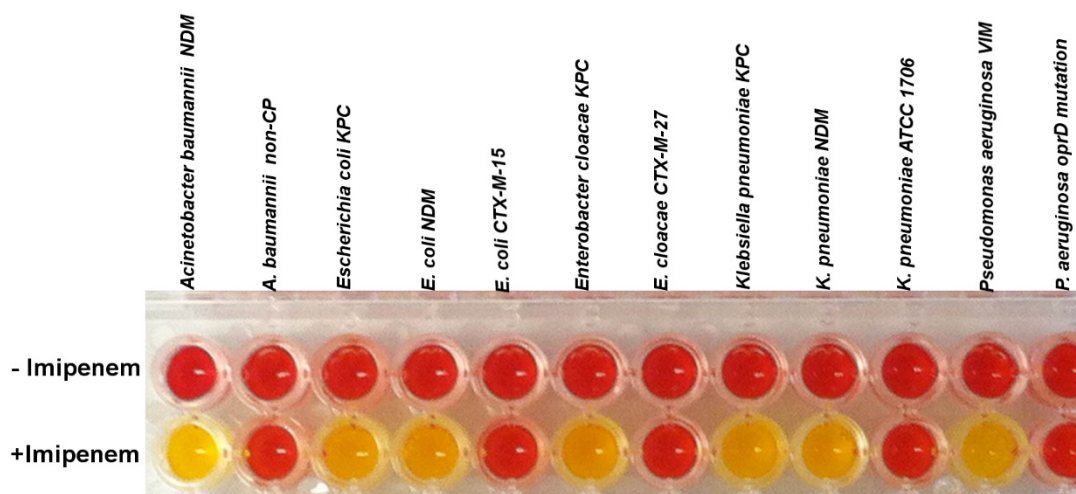
1.1.2. Métodos bioquímicos

El Carba NP test (fig.2) es un método bioquímico que fue especialmente diseñado para la detección de productores de carbapenemasas. Detecta un cambio en el pH debido a la hidrólisis del imipenem en presencia de una enzima carbapenemasa en menos de 2 horas. Sin la necesidad de ninguna equipación particular, las β -lactamasas son rápidamente extraídas de las bacterias e incubadas con una solución de imipenem y rojo de fenol [10]. Un cambio de rojo a amarillo en la coloración del medio indica positividad. Este test tiene una excelente sensibilidad para la detección de carbapenemasas de tipo KPC, NDM, VIM y NDM [11], sin embargo no muestra los mismos resultados para la detección de carbapenemasas de tipo OXA-48. [12,13]. El test ha demostrado también su capacidad de detección sobre Enterobacteriaceae productoras de carbapenemasas y

Pseudomonas spp directamente de hemocultivos. El test también ha sido recomendado por el CLSI para la confirmación de carbapenemasas en Gram negativos [14]. Este test ha sido ya comercializado en un kit, RAPIDEC Carba NP test (BioMérieux) rápido y fácil de utilizar [15].

El Blue-Carba es otro método bioquímico, utilizado para la detección de carbapenemasas, en este caso utilizando un indicador diferente, azul de bromotimol, y un protocolo similar al Carba NP test. En general, parece muy similar al Carba NP test, pero tiene una sensibilidad mejor en el caso de las enzimas de tipo OXA [16].

Figura 2. Identificación bioquímica mediante el Carba NP test de bacterias productoras de carbapenemasas (Hombach M *et al*, JCM, 2015).



1.1.3. Métodos moleculares

Los métodos moleculares y fundamentalmente aquellos basados en la PCR, se basan en la amplificación específica de secuencias de ácidos nucleicos. La PCR se utilizó inicialmente para la identificación y cuantificación de los agentes causantes de las infecciones a través de la amplificación específica de secuencias del genoma de un determinado patógeno [17]. Poco a poco, con el avance en el conocimiento de la genética de la resistencia antibiótica, las técnicas basadas en la PCR se han desarrollado para detectar determinantes de resistencia para una gran variedad de antibióticos en un gran número de especies bacterianas. La mayor ventaja de las técnicas moleculares,

es que pueden llevarse a cabo en un periodo relativamente corto de tiempo y que además puede llevarse a cabo directamente de la muestra clínica sin necesidad del aislamiento previo del patógeno. La PCR tiene por tanto el potencial de reducir significativamente los tiempos de respuesta y proporcionar resultados con gran fiabilidad. Además nos permite cuantificar el número de copias del gen de resistencia en la muestra.

En los últimos años la PCR que ha experimentado una mayor expansión es la PCR en tiempo real. Consiste en una amplificación con una diana específica a la que se unirá una sonda que contiene un agente emisor de fluorescencia. A medida que se amplifique el ADN, se observará un aumento exponencial de la fluorescencia. La PCR con sondas TaqMan, se basan en la actividad exonucleasa 5'-3' de la Taq polimerasa para escindir una sonda marcada. La escisión de esta sonda emite fluorescencia. El empleo de estas sondas ha aumentado significativamente la especificidad de la detección de la PCR a tiempo real. Por otro lado la PCR a tiempo real, tiene la opción de ser simple, o múltiple. La utilización de una PCR múltiple permite la caracterización de diferentes mecanismos en una sola reacción de amplificación, circunstancia especialmente útil en el estudio de β -lactamasas de amplio espectro debido a su diversidad. Requiere de varios pares de iniciadores que sean altamente específicos de la diana a amplificar, que tengan condiciones de amplificación semejantes y que amplifiquen fragmentos de tamaños diferentes que permitan su fácil diferenciación. En la última década se han propuesto diferentes PCRs múltiples para la detección de genes que codifican enzimas plasmídicas de tipo AmpC, BLEEs y carbapenemasas. Se han descrito diferentes limitaciones a algunas de estas técnicas entre las que destacan el tamaño poco discriminativo de los amplicones que dificulta su diferenciación, la utilización de diferentes condiciones de amplificación que obliga a realizar varias PCRs múltiples en paralelo, la amplificación cruzada con genes de β -lactamasas cromosómicas intrínsecas de determinadas especies y, en general, la inclusión de un número limitado de genes, con frecuencia agrupados por familias como carbapenemasas de clase A o de clase B. Recientemente se han comercializado diferentes sistemas basados en PCRs múltiples y algunas permiten el diagnóstico rápido de BLEE y carbapenemasas, en general con una alta sensibilidad y especificidad [18].

BioMerieux ha desarrollado una técnica en tiempo real, muy rápida (<2 h), muy sensible y específica (New NucliSENS EasyQ KPC) para la detección de aislados productores de KPC [19]. Check-Points Health BV (Wageningen, Países Bajos) ha desarrollado una PCR multiplex a tiempo real (Check-MDR ESBL) para detectar los genes correspondientes a SHV/TEM y CTX-M [20]. De forma similar el kit Check-MDR Carba identifica rápidamente los genes de KPC, IMP, VIM, NDM y OXA-48 [21]. El kit Check-Direct CPE es otro test multiplex comercial que detecta carbapenemasas, y que ha sido evaluado directamente de hisopos rectales y comparado los resultados con el cultivo, observándose una sensibilidad y una especificidad del 100% y 94% respectivamente [22]. GeneXpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA) (fig.3) ha desarrollado un *cartridge* para la detección de microorganismos portadores de carbapenemasas, detectando KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48, siendo únicamente necesarios 2 minutos de tiempo de manejo y 45 min para proporcionar resultados [23]. El test tiene una alta sensibilidad y especificidad, 100% y 99% respectivamente. Además su fácil manejo y la robustez de la técnica, lo hacen una herramienta muy útil para los laboratorios de urgencias de microbiología clínica. Recientemente, nuestro grupo ha realizado una evaluación del LightMix® modular Kit (TIB Molbiol, Berlin, Alemania) (fig.4), que consiste en una PCR multiplex y modular que detecta los genes KPC, NDM, VIM, IMP y OXA-48, con excelentes resultados de sensibilidad y especificidad (100%) con respecto a GenXpert® para búsqueda de portadores a partir de hisopos perineales y rectales. Sus principales ventajas son su coste, que es un 75 % más bajo que el GenXpert® y la posibilidad de su uso modular, que permite elegir las dianas que queremos detectar (formato singleplex o multiplex) en función de la sospecha clínica o epidemiología local, favoreciendo una disminución aún mayor del coste final de la técnica [24].

Figura 3. Identificación molecular mediante el GenXpert® de una bacteria productora de OXA-48.

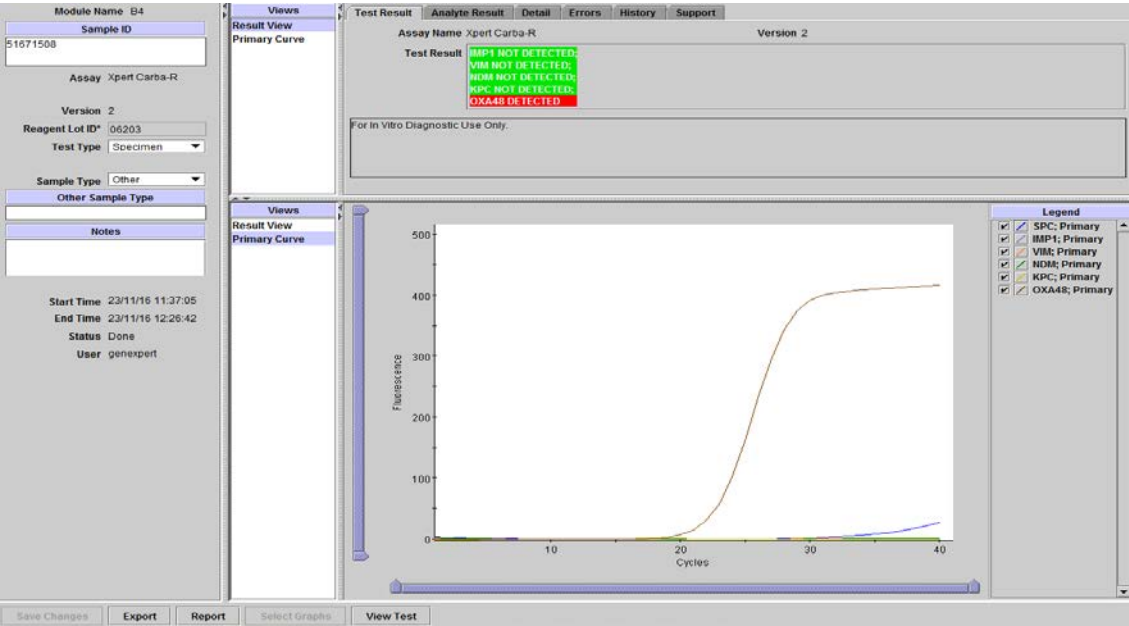
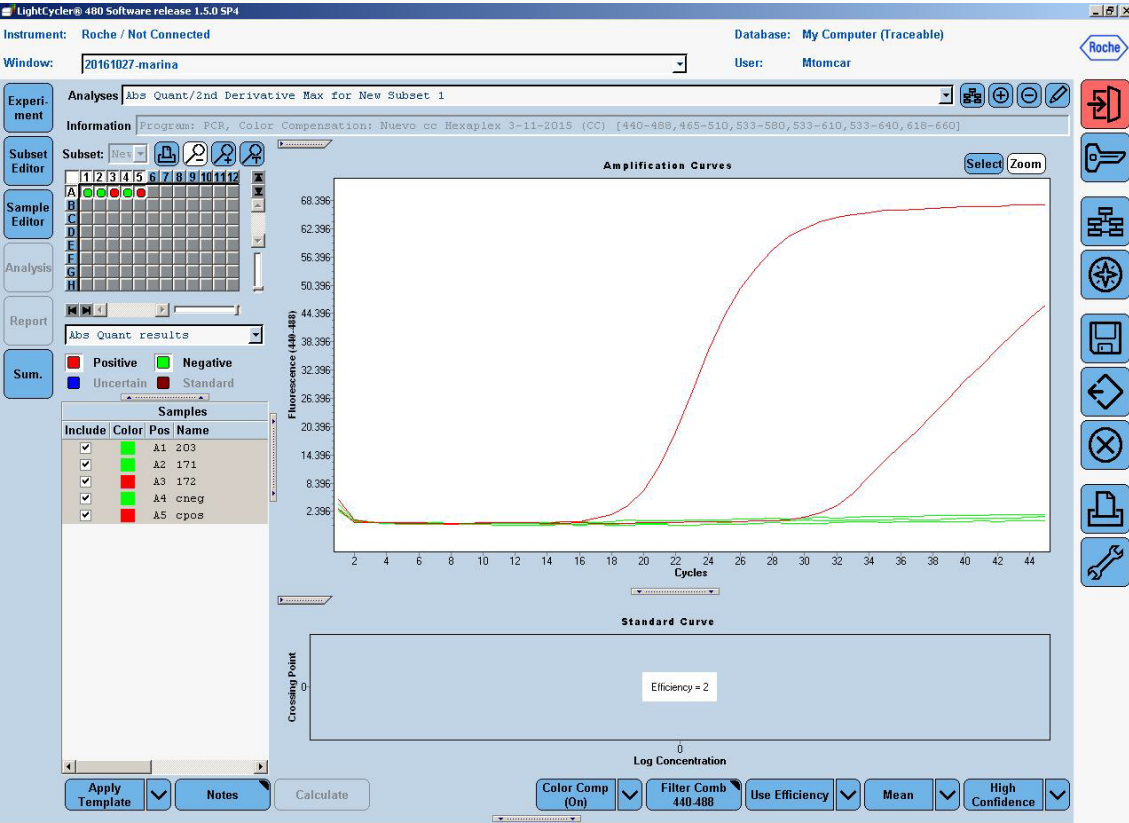


Figura 4. Identificación molecular mediante el LightMix® modular Kit de una bacteria productora de OXA-48.



Por otro lado, los microarrays identifican la presencia de secuencias específicas de ácidos nucleicos usando oligonucleótidos complementarios. Debido a que estos oligonucleótidos pueden estar ensamblados en soportes sólidos, con espacios muy pequeños, este método tiene la ventaja de que se pueden detectar cientos de secuencias en un único ensayo. Es por esto, que el método ofrece la posibilidad de crear arrays con la habilidad de detectar un gran abanico de genes de resistencia.

Numerosos estudios han empleado los microarrays para la detección de β -lactamasas en bacilos Gram negativos, algunos de los cuáles proporcionan el resultado en unas pocas horas [25-26]. Uno de estos estudios combina una PCR a tiempo real con un microarray para identificar patógenos respiratorios causantes de neumonía asociada a ventilación mecánica y detección de la presencia de 24 genes asociados a resistencia a β -lactámicos directamente de la muestra clínica [27]. Check-Points ha desarrollado varios microarrays automatizados para detectar también genes de resistencia a β -lactámicos [28]. Por ejemplo, el kit Check-MDR CT102, detector β -lactamasas de espectro extendido y las más importantes carbapenemasas (VIM, IMP, OXA-48-like, KPC, y NDM), mostrando un acuerdo con la PCR y secuenciación del 99% [29]. Alere Inc (Upper Saddle River, NJ) también ha preparado un microarray que detecta factores de virulencia de *Escherichia coli* y los más importantes genes de resistencia, incluyendo CTX-M, KPC, NDM, GIM, OXA-23, OXA-48, VIM, IMP, y Qnr [30]. Nanosphere Technology (Northbrook, IL) ha desarrollado un microarray automatizado muy prometedor (Verigene Nucleic Acid Test) para detectar especies bacterianas y genes de resistencia en 2 horas [31]. En concreto, el test Verigene para la detección de bacilos Gram negativos en hemocultivos, es capaz de detectar las especies microbianas más frecuentes junto con las enzimas de resistencia de tipo CTX-M, KPC, NDM, VIM, IMP y OXA. Varios autores han evaluado su validez en hemocultivos, obteniendo sensibilidades y especificidades desde el 90% al 100% [32].

La tecnología de microarrays ofrece la posibilidad de detectar un gran número de genes de resistencia en un único ensayo, en oposición a la PCR. Por esta razón, los microarrays son ideales para bacterias con un gran número de posibles mecanismos de resistencia, como es el caso de las β -lactamasas en bacilos Gram negativos. Sin embargo, los datos obtenidos en los microarrays de forma similar a la PCR, no siempre se relacionan con la

resistencia fenotípica. Además, el método tiene limitada habilidad a la hora de detectar mecanismos de resistencia incipientes cromosómicos mutacionales y sin caracterizar.

Los avances en la tecnología de secuenciación han hecho posible secuenciar un genoma entero bacteriano completo en muy poco tiempo. Estos métodos, acoplados con herramientas bioinformáticas que pueden rápidamente ensamblar y analizar una cantidad masiva de información, abren la posibilidad de estas técnicas de ser utilizadas en la detección de la resistencia antibiótica. Una serie de estudios han descrito la posibilidad de secuenciar un número pequeño de aislados clínicos para caracterizar los determinantes genéticos de resistencia [33-34]. El objetivo de estos estudios ha sido caracterizar cepas con interés en sus perfiles de resistencia fenotípicos. En el estudio descrito por Zankari E. *et al* se utilizó la secuenciación masiva de un genoma completo, para caracterizar los perfiles de resistencia de 200 aislados bacterianos de 4 especies diferentes sobre una serie de antibióticos y los resultados fueron comparados con los métodos fenotípicos de susceptibilidad [35]. Se observó una alta correlación (99.74%) entre las dos técnicas, demostrando que los datos obtenidos de la secuenciación del genoma pueden correlacionarse muy bien en algunos casos con los resultados fenotípicos.

Todas estas técnicas tienen el gran potencial de mejorar la evolución clínica del paciente reduciendo el tiempo de tratamiento empírico y el coste derivado del ingreso o tratamiento inadecuado. Es por ello obligado en el ámbito de la microbiología, la mejora constante de las técnicas rápidas de detección de resistencias antibióticas. Sin embargo, aunque ya existen estudios coste-eficacia para valorar el impacto de estas técnicas en el entorno hospitalario, son necesarios más estudios para valorar adecuadamente el impacto de cada una de ellas en la práctica asistencial y su perfil de aplicación.

1.2. MALDI-TOF MS: de la teoría a la práctica

La espectrometría de masas es una técnica de determinación estructural que permite determinar la distribución de las moléculas de una sustancia en función de su masa.

Para obtener el espectro de masas de un compuesto orgánico, es necesario ionizar sus moléculas. Existen diversos métodos de ionización, como el de impacto electrónico, la

ionización química, el bombardeo con átomos veloces, la electropulverización y la desorción-ionización por láser con ayuda de una matriz. Este último método será el que utilice la tecnología MALDI-TOF MS (fig.5).

Con este método, la sustancia problema se mezcla con un disolvente que contiene una matriz (una sustancia orgánica sólida de moléculas). A continuación se evapora el disolvente y queda una disolución sólida de la sustancia problema en la matriz, de modo que el analito queda embebido en esta matriz. Esta matriz, facilitará que en la ionización no se produzcan demasiadas rupturas de la estructura ni se destruya la molécula problema. Ahora la sustancia, debe pasar a la cámara de ionización, dónde se irradia con un láser de gran intensidad (N_2 , 60 Hz). La energía del láser es principalmente absorbida por las moléculas de la matriz, que subliman rápidamente arrastrando al analito, que se ioniza durante el proceso.

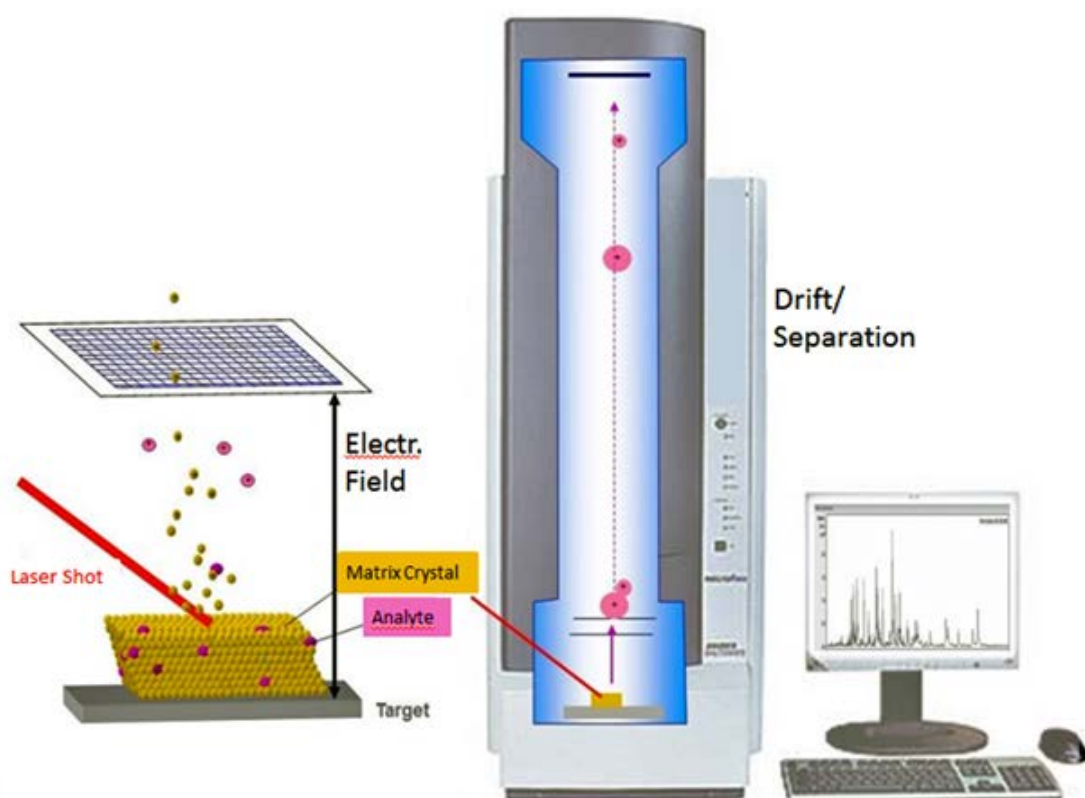
El pico base, o el pico del ión molecular, da la información más importante del espectro de masas, que es la masa molecular del analito. Las fragmentaciones del ión molecular son procesos unimoleculares. Además el rendimiento de la etapa de ionización es muy bajo y finalmente el proceso transcurre en estado gaseoso y en condiciones de alto vacío, por lo que es muy improbable que dos iones colisionen. Es por ello, que es despreciable el porcentaje de partículas con carga superior a $+e$, es decir la carga será de $z=1$, que en la práctica implica que la separación masa/carga, tengo lugar únicamente en función de la carga.

El analizador es el siguiente elemento fundamental de un espectrómetro de masas. En este equipo, contaremos con un analizador de tiempo de vuelo (TOF). Consiste en una región donde se establece un potente campo magnético perpendicular a la trayectoria rectilínea común de todas las partículas cargadas. De este modo, se dispersan en tantas trayectorias circulares como clases de partículas existan. Los iones poseen la misma energía cinética, pero al tener distinta masa, llegan al detector a velocidades distintas.

El último elemento de un espectrómetro de masas, es el detector. Son dispositivos que convierten una corriente de iones en una corriente eléctrica, cuya intensidad permite evaluar la abundancia relativa de cada tipo m/z de fragmentos catiónicos. Estas abundancias aparecen expresadas en el espectro de masas, como picos de masas,

expresadas en porcentajes relativos respecto al porcentaje de la altura del pico base. Todos los espectros expresan intensidades relativas, es por eso que los distintos espectros adquiridos no son intercompatibles entre sí.

Figura 5. Esquema del proceso de detección mediante MALDI-TOF MS (www.ua-bw.de).



John B. Fenn consiguió en 1988, tras 2 décadas de investigación, analizar proteínas mediante EM ESI [36, 37]. Koichi Tanaka (Shimadzu Corp.) consiguió en 1987, utilizando como matrices suspensiones de nanopartículas metálicas en glicerol, demostrar que era posible ionizar y detectar proteínas con masas en el rango de las decenas de kDa [38]. Michael Karas y Franz Hillenkamp, del Instituto de Biofísica de la Universidad de Frankfurt, introdujeron el uso de una matriz orgánica capaz de absorber la energía del láser y transferir una parte a las moléculas de la muestra e ionizarlas. Aunque inicialmente Karas y Hillemkamp utilizaron el método para analizar aminoácidos, en

1988 publicaron sus primeros análisis con proteínas [39]. La técnica, a la que llamaron MALDI, resultó ser más sencilla y más sensible que la de Tanaka, y rápidamente se extendió su uso. En 1996 se demostró que podían utilizarse los perfiles de proteínas obtenidos mediante MALDI-TOF MS para identificar bacterias partiendo de células intactas [40-42] y pocos años después salían al mercado los primeros sistemas comerciales. El método de Karas y Hillenkamp es el precursor de la metodología actual y el que mayor impacto ha tenido.

1.2.1. El MALDI-TOF MS en la identificación y trascendencia clínica

En 2009, se publicó el que probablemente sería el artículo clave para dar a conocer de forma general a los especialistas implicados en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas las posibilidades del MALDI-TOF MS en la identificación rutinaria de bacterias [43]. Un año después, se publicó en España el primer artículo en el que se hacía una valoración global de la utilidad del MALDI-TOF MS para la identificación de microorganismos de origen clínico [44]. Desde entonces, el número de publicaciones sobre aplicaciones clínicas del MALDI-TOF MS se ha incrementado exponencialmente, sobre todo en lo que se refiere a la identificación de diferentes grupos de microorganismos a partir de cultivos [44-47].

En conjunto los estudios demuestran una alta eficacia en la identificación de bacterias, micobacterias y levaduras. La eficacia alcanzada en el caso de bacterias gramnegativas y levaduras es, en la mayor parte de los casos, excelente, mientras que en bacterias grampositivas y bacterias anaerobias es algo inferior a las anteriores. Recientemente se ha mejorado la base de datos para la identificación de micobacterias mostrando excelentes resultados [48] (fig.6).

Figura 6. Impacto de la mejora en la base de datos para la identificación de micobacterias no tuberculosas (Rodríguez-Sánchez B *et al*, JCM, 2016).

TABLE 3 Impact of database update on identification of clinical isolates

Mycobacterium species	No. of isolates	No. of references in:		Mean (range) log(score) value(s) with:	
		v2.0	v3.0	v2.0	v3.0
<i>M. abscessus</i>	13	11	24	2.036 (1.815–2.183)	2.059 (1.830–2.209)
<i>M. arupense</i>	1	1	8	1.918	2.067
<i>M. avium</i>	17	10	39	1.872 (1.587–2.222)	1.963 (1.738–2.298)
<i>M. bohemicum</i>	1	3	10	1.903	2.048
<i>M. chelonae</i>	6	10	19	2.058 (1.989–2.208)	2.084 (2.017–2.208)
<i>M. europaeum</i>	1	1	2	1.847	1.847
<i>M. fortuitum</i>	17	9	20	2.052 (1.648–2.393)	2.160 (1.806–2.393)
<i>M. gordonae</i>	8	10	23	1.824 (1.543–2.123)	1.904 (1.737–2.226)
<i>M. haemophilum</i>	1	1	6	1.891	2.058
<i>M. insubricum</i>	1	3	3	2.018	2.018
<i>M. chimaera-M. intracellulare</i> group	6	9	32	1.971 (1.705–2.137)	2.105 (1.939–2.170)
<i>M. kansasii</i>	8	14	26	1.927 (1.636–2.243)	1.992 (1.636–2.243)
<i>M. lentiflavum</i>	5	3	13	2.063 (2.014–2.132)	2.175 (2.043–2.308)
<i>M. mageritense</i>	2	2	4	2.146 (2.091–2.207)	2.249 (2.214–2.310)
<i>M. malmoense</i>	1	5	14	2.233	2.233
<i>M. marinum</i>	1	8	18	2.345	2.345
<i>M. mucogenicum-M. phocaicum</i> group	2	3	21	2.218/2.101 ^a	2.362/2.127 ^a
<i>M. palustre</i>	1	2	2	2.086	2.086
<i>M. peregrinum</i>	2	1	15	2.349/2.155 ^b	2.349/2.299 ^b
<i>M. porcinum</i>	1	2	8	2.150	2.361
<i>M. shimoidi</i>	1	1	6	2.225	2.225
<i>M. simiae</i>	1	3	13	2.166	2.166
<i>M. smegmatis</i>	1	5	9	2.034	2.034
<i>M. szulgai</i>	1	5	15	2.125	2.199
<i>M. triplex</i>	1	1	2	1.933	2.019
<i>M. xenopi</i>	4	5	18	1.852 (1.485–2.099)	2.093 (1.947–2.237)
Total	104	128	370		

^a Score values for the two representative *M. mucogenicum-M. phocaicum* group strains.

^b Score values for the two representative *M. peregrinum* strains.

Existen muchos estudios que muestran protocolos y resultados muy discrepantes tanto en sensibilidad como en especificidad en función de los procedimientos empleados y en los criterios establecidos para considerar una identificación como correcta [49-51]. La fiabilidad de la identificación de *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis* es cuestionable, ya que frecuentemente estos se identifican erróneamente como *S. pneumoniae* [52]. También la identificación del grupo anginosus

es problemática. La indentificación de *S. anginosus* y *S. constellatus* es adecuada a nivel de especie, sin embargo no lo es para *S. intermedius* [53].

La identificación correcta de las enterobacterias se realiza en la práctica totalidad de los casos. La capacidad de MALDI-TOF MS para la correcta identificación de bacilos gramnegativos no fermentadores es algo menor [54-55].

El MALDI-TOF MS es especialmente útil frente a los métodos convencionales en la identificación de microorganismos de cultivo difícil o lento (bacterias anaerobias, *Actinomycetales*, bacilos gramnegativos de crecimiento lento, etc.) ya que supera problemas existentes en los protocolos de cultivo [56]. También ha mostrado gran utilidad en la identificación rápida de bacterias con gran patogenicidad como *Bacillus anthracis*, *Brucella melitensis*, *Francisella tularensis* o *Yersinia pestis* [57-58] y se han desarrollado protocolos específicos de bioseguridad [59].

En relación con el grado de fiabilidad de la identificación mediante este sistema, el fabricante de Microflex LT Biotyper (Bruker Daltonics) considera una identificación adecuada a nivel de género si la muestra presenta un *spectral score* comprendido entre 1.700 y 1.999 (parámetro que indica el grado de correlación entre el espectro obtenido y los valores de la base de datos del equipo), exigiendo para la identificación correcta de especie un valor superior a 2.000 [60]. Con objeto de mejorar la sensibilidad diagnóstica, algunos autores han planteado la posibilidad de disminuir la exigencia técnica de esta correlación, considerando una identificación como fiable con valores por debajo de 1.700 si las tres primeras entradas corresponden al primer patógeno y otros algoritmos. Esta estrategia, aunque mejora la sensibilidad de la técnica al lograr un mayor número de identificaciones, no está exenta de riesgo y debe manejarse con extrema precaución [61].

Por tanto, podemos asegurar que la importancia del tamaño y extensión de la base de datos que utilice el software como referencia para comparar los espectros obtenidos es vital. A medida que se vayan introduciendo mejoras en la base de datos, los resultados de identificación que vayamos obteniendo serán más precisos cada vez. La evaluación de las bases de datos está en continua extensión para todo tipo de patógenos, ya sean bacterias, micobacterias u hongos [62]. El MALDI-TOF MS está configurado de modo que

se puedan realizar nuevas incorporaciones en la base de datos, por lo que también existen estudios evaluando estas nuevas entradas frente a las propias y pre-existentes en el equipo [63,64].

El MALDI-TOF MS tiene una aplicación muy importante que es la identificación sobre muestra clínica directa. Esta aplicación se ha desarrollado sobre hemocultivos y sobre muestras de orina. En estos casos, el proceso necesita de un paso previo de extracción bacteriana de la muestra. Se han llevado a cabo diversos protocolos con éxito en ambos casos [65, 66]. Existe un reactivo comercial (Sepsityper, Bruker Daltonik) que facilita el proceso. El objetivo es conseguir eliminar del medio los restos celulares y proteicos que no pertenezcan a la bacteria para conseguir aislarla con el máximo rendimiento. En el caso de las identificaciones de bacteriemias polimicrobianas, aunque hay diferencias en función de los procedimientos empleados los resultados no son tan buenos. Se ha perfeccionado recientemente el análisis bioinformático de perfiles proteicos mixtos con mejoras sustanciales [67].

La limitación fundamental de esta técnica es la necesidad de una carga bacteriana elevada, de entre 10^5 y 10^8 UFC/ml de medio de cultivo aunque se ha planteado que se pueden obtener resultados con MALDI-TOF MS con inóculos menores, por lo que se han desarrollado modelos experimentales para la identificación directa desde el hemocultivo que muestran resultados positivos entre 1,7 y 2,3 h antes de positivizarse [68]; sin embargo, todavía debe analizarse con más precisión para conocer su verdadera importancia clínica.

Desde el desarrollo de MALDI-TOF MS, diferentes estudios han demostrado cómo la implicación de equipos de bacteriemias o PROA, demuestran impacto directo en parámetros clínicos. Clerc *et al* analizaron bacteriemias por bacilos gramnegativos en un área con baja prevalencia de cepas productoras de β -lactamasas de espectro extendido y de carbapenemasas y comunicaron que la tinción de Gram tuvo impacto clínico, ya que permitió el ajuste del tratamiento en el 20,8% de los casos; también señalan que la información proporcionada por MALDI-TOF MS, 2 o 3 h después, conllevó el cambio de tratamiento empírico en el 35,1% de los casos [69]. Otro estudio muestra que el uso del MALDI-TOF MS supone un 11,3% de incremento en el número de pacientes que reciben tratamiento antibiótico correcto en las primeras 24 h tras la positividad del hemocultivo

(64,0% en el grupo control frente al 75,3% en el grupo sobre el que se intervino) [70]. Huang *et al* comunican que se produce una disminución en el tiempo de identificación del microorganismo causante del proceso (84,0 frente a 55,9 h), en el tiempo de terapia efectiva (30,1 frente a 20,4 h) y de terapia óptima (90,3 frente a 47,3 h). También informan que se logra disminuir la mortalidad, el tiempo de estancia en unidades de críticos y las bacteriemias recurrentes [71]. Pérez *et al* comunican que la utilización de MALDI-TOF MS dentro de un grupo PROA produjo una reducción de las estancias medias hospitalarias y en unidades de cuidados intensivos y, por tanto, una disminución significativa de los costes hospitalarios [72].

Por lo tanto podemos concluir que la utilización del MALDI-TOF MS para la identificación rápida de patógenos es una de las aplicaciones más útiles y eficaces en la práctica clínica de hoy en día en los laboratorios de microbiología.

1.2.2. Otras aplicaciones del MALDI-TOF MS: epidemiología y serotipado.

Los sistemas de tipificación bacteriana engloban un conjunto de métodos microbiológicos que permiten diferenciar cepas pertenecientes a una misma especie. El objetivo final de cualquiera de estos métodos es establecer la relación entre aislamientos vinculados epidemiológicamente. Este tipo de análisis posibilita, entre otros aspectos, el estudio de brotes hospitalarios facilitando tanto su detección precoz como la caracterización de modelos de transmisión de infecciones entre personas, material inanimado y el diseño de medidas de control [73].

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas de tipificación molecular. Entre ellas merecen especial mención la PFGE, y el MLST. Dentro de las técnicas de tipificación basadas en PCR destacan también el MLVA, AFLP y rep-PCR. Todas se pueden utilizar en el estudio de brotes y de rutas de transmisión entre pacientes y hospitales, ofreciendo resultados de forma rápida y con un buen nivel discriminatorio [74-76]. Las nuevas metodologías de secuenciación WGS o NGS aparecen como herramientas potentes y atractivas para la detección de variaciones en el genoma bacteriano y las investigaciones epidemiológicas. Sin embargo, aunque estos sistemas de secuenciación de segunda generación ofrecen un amplio abanico de posibilidades, en el momento actual su

utilidad es limitada, ya que precisan importantes recursos informáticos para el análisis de datos junto con personal especializado y bien entrenado. Además, su precio es elevado y requiere de un tiempo de realización largo.

En general, aunque todas las técnicas moleculares descritas han probado su utilidad a lo largo de los años, resultan en su mayoría excesivamente laboriosas, caras y con tiempos de realización largos, lo que limita su utilidad en aplicaciones a tiempo real. Es en este contexto donde, gracias a su rapidez, bajo coste y simplicidad en su realización, el MALDI-TOF MS aparece como una alternativa muy prometedora.

El análisis epidemiológico mediante EM se puede llevar a cabo con 2 enfoques diferentes: mediante el uso de librerías espectrales y/o por aproximaciones informáticas. Sea cual sea el enfoque que se utilice, es un hecho contrastado que los métodos de subtipado y agrupamiento (*clustering*) son muy sensibles a las condiciones de crecimiento bacteriano, a la intensidad de los picos y a la calidad del espectro de masas utilizado, por lo que, para conseguir repetitividad en los ensayos, es muy importante intentar normalizar en lo posible una serie de puntos críticos que abarcan todas las fases del proceso: desde el cultivo bacteriano y la preparación de la muestra hasta la adquisición y posterior análisis de los espectros.

El método más simple para comparar distintas cepas es el cálculo del CCI entre los espectros adquiridos, teniendo en cuenta que un coeficiente $> 0,9$ indica una fuerte correlación. Las relaciones entre espectros pueden ser representadas mediante matrices de intensidad de color. Otra posibilidad es la construcción de dendrogramas que, mediante niveles de distancia arbitraria, muestren lo relacionados que están entre sí los organismos en estudio (fig.7). También se pueden emplear otras técnicas de clasificación no basadas en medidas de distancia; la más conocida es el análisis de PCA. El objetivo del PCA es reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos en el que hay un gran número de variables interrelacionadas (en nuestro caso la intensidad de los picos) al tiempo que conserva su variación.

Figura 7. Dendrograma construido mediante MALDI-TOF MS para el tipado de *K. pneumoniae* multirresistente (Berrazeg M *et al*, Plos One, 2013).

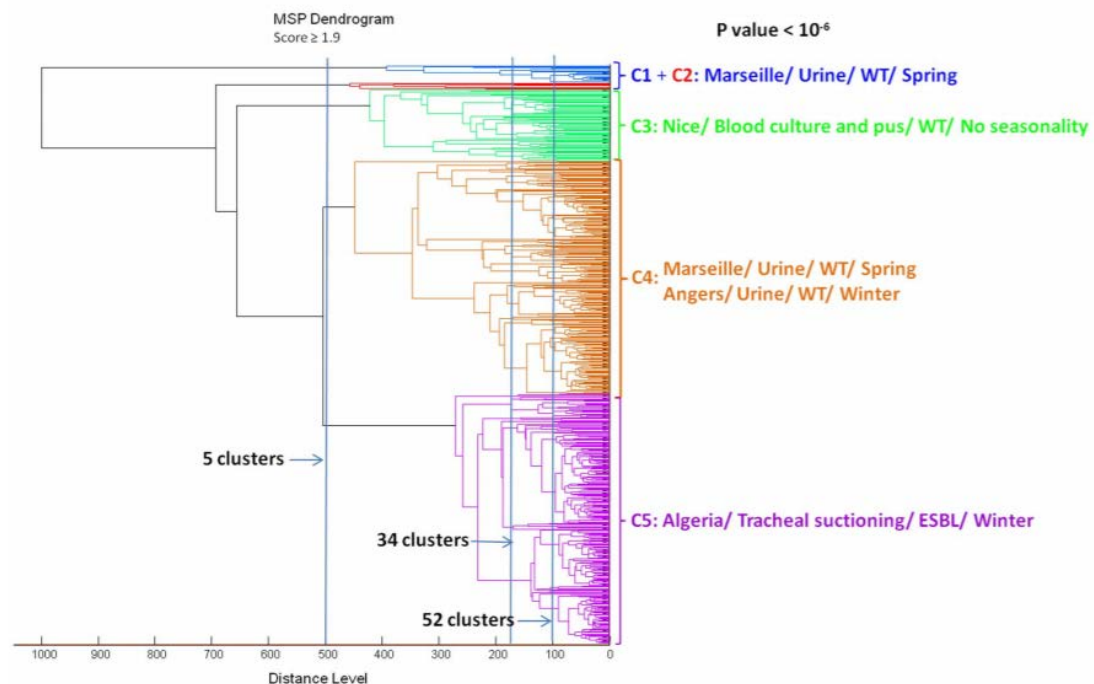


Figure 1. Geographic location of hospitals implicated in this study. 1: Tlemcen, 2: Sidi Bel Abbes, 3: Oran, 4: Annaba, 5: Marseille, 6: Nice, 7: Angers.
doi:10.1371/journal.pone.0061428.g001

La posibilidad de distinguir, dentro de una especie bacteriana, aquellos clones especialmente virulentos o con mayores niveles de resistencia de una manera rápida y sencilla es uno de los retos más atrayentes de la microbiología actual. En este sentido, se ha utilizado el MALDI-TOF MS para detectar complejos clonales de alto riesgo dentro de *E. coli* con resultados muy prometedores [77,78]. Algo similar sucede con *Klebsiella pneumoniae*. Aunque algunos trabajos apuntan a un menor poder discriminatorio que el de otras técnicas más convencionales, el MALDI-TOF MS se ha empleado con éxito para identificar y tipificar aislados clínicos de esta especie [79-81]. Existen también datos relativos a otras especies y géneros dentro de las enterobacterias. La EM ha demostrado su utilidad para distinguir de manera satisfactoria distintas serovariedades de *Salmonella* spp. [82-84], para caracterizar un brote de *Enterobacter cloacae* resistente [85] y en el biotipado de *Serratia marcescens* [86]. Los datos de que se dispone para el resto de los bacilos gramnegativos no fermentadores, aunque alentadores, no pueden considerarse concluyentes [87,88]. Varios autores han estudiado la utilidad del MALDI-TOF MS para diferenciar los principales complejos clonales de *Staphylococcus aureus*,

centrándose su mayoría en el análisis de *S. aureus* resistente a meticilina (CC5, CC8, CC22, CC30, CC45 y CC398) [89-91].

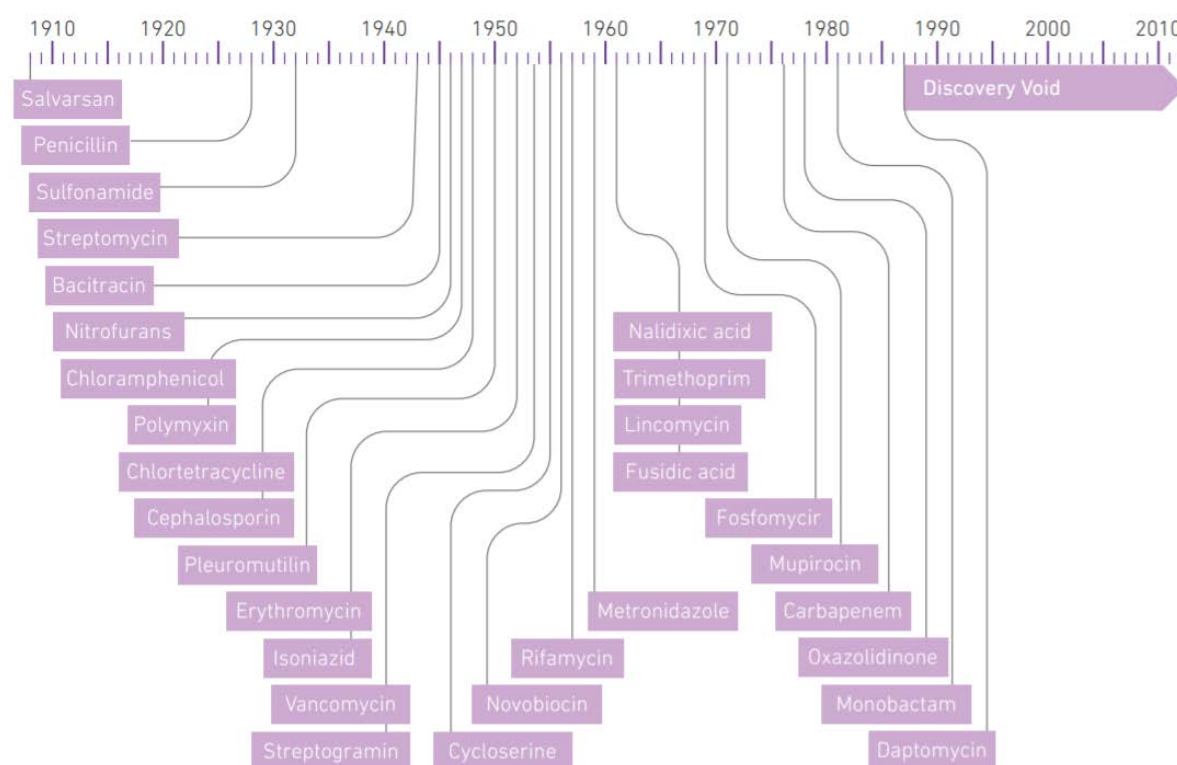
La EM se presenta como una atractiva opción para la tipificación bacteriana por su simplicidad y rapidez. Otro punto a su favor es el uso rutinario en la mayoría de laboratorios de microbiología clínica para la identificación de especies. Esto supone que, con un incremento mínimo de trabajo y costes, los datos generados podrían ser utilizados para estudios epidemiológicos. Sin embargo, en la actualidad existe una gran variación en los resultados obtenidos, probablemente debida a las diferentes condiciones de cultivo y preparación de las muestras y a los distintos enfoques utilizados para el análisis. Cabe esperar que la estandarización de las condiciones de análisis y la ampliación de las bases de datos permitan el completo desarrollo de esta técnica.

1.3. Resistencia a antibióticos en *Enterobacteriaceae*

Desde que en 1945, Alexander Fleming, descubriera la penicilina, el desarrollo de nuevos antibacterianos se ha seguido de la detección de su resistencia. El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo normal en los microorganismos, pero está siendo acelerado debido a la presión selectiva del uso masivo de antibióticos.

Consecuentemente, los antibióticos se han convertido cada vez en drogas menos efectivas, resultando en un problema creciente y alarmante en la seguridad global ya que cada vez existen menos opciones terapéuticas. Hasta los años 70, se desarrollaron muchos antibióticos frente a los cuáles los microorganismos eran inicialmente sensibles. Sin embargo, las últimas clases de antibióticos fueron descubiertas en los años 80 (fig. 8). Es por tanto esencial, preservar los antibióticos existentes, para minimizar el desarrollo y la resistencia a los antibióticos disponibles en la actualidad.

Figura 8. Fechas de descubrimiento de las distintas clases de antibióticos
(<http://www.who.int/antimicrobial-resistance/en/>).



El estudio de la problemática de la resistencia antibiótica es muy complejo y muy relevante. Varios informes tanto de organismos nacionales como internacionales, avalan la situación que estamos viviendo en torno a la resistencia antibiótica. La OMS aprobó el 25/05/2015 un plan de acción en la Asamblea Mundial de Salud para afrontar la creciente resistencia a los antibióticos ya que sólo una cuarta parte de 133 países que se encuestaron contaban con estrategias diagnósticas para la detección temprana de la resistencia antibiótica y con planes para preservar la efectividad del uso de antibióticos [92]. El plan Obama publicado en marzo de 2015, incluye un presupuesto de veinte millones de dólares para desarrollar pruebas diagnósticas para la detección temprana de la resistencia bacteriana, y se recomendaba duplicar la inversión del gobierno en esta problemática y financiar empresas para el desarrollo de nueva tecnología y nuevos antibióticos [93]. La Agencia Española del Medicamento aprueba en 2014 un Plan Nacional de Resistencia a los Antibióticos, debido a una necesidad inmediata de frenar el continuo aumento de la problemática y la escasez de tratamiento alternativos, considerándolo uno de los mayores problemas de salud pública en la actualidad [94].

1.3.1. Mecanismos de resistencia en *Enterobacteriaceae*

La familia *Enterobacteriaceae*, es una familia heterogénea y amplia de bacilos Gram negativos que residen en el colon del hombre sin causar enfermedad aunque con frecuencia son causantes de un número considerable de infecciones, tanto en pacientes con inmunidad conservada como en inmunodeprimidos. El gran número de especies dentro de la familia de las enterobacterias conlleva una gran variabilidad de patrones de resistencia natural. Esta diversidad se ve, además, incrementada por la posibilidad de adquirir genes de resistencia tanto de microorganismos de la misma especie como de otras. En los próximos apartados, resumiremos, los mecanismos de resistencia más importantes de esta familia de bacterias, que son a su vez los que intentaremos detectar en los capítulos posteriores de esta tesis mediante MALDI-TOF MS.

1.3.1.1. Resistencia a β -lactámicos

Los antibióticos β -lactámicos son una amplia familia de antibióticos bactericidas y uno de los grupos más numerosos y de mayor utilización en clínica, que incluye las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos [95]. Aunque la resistencia a los β -lactámicos está definida por distintos mecanismos (producción de enzimas, alteraciones de la permeabilidad, alteración de la diana y, presumiblemente, expresión de bombas de expulsión activa), el principal mecanismo de resistencia a β -lactámicos en enterobacterias es el enzimático, por producción de las β -lactamasas.

Las β -lactamasas se pueden clasificar en diferentes grupos, según las distintas clasificaciones. La clasificación de Bush K. *et al* [96] separa las β -lactamasas en función de su perfil hidrolítico y de sus inhibidores y distingue cuatro categorías y múltiples subgrupos. La clasificación de Ambler distingue cuatro clases de β -lactamasas en función de sus secuencias aminoacídicas. Las de las clases A, C y D son serina β -lactamasas y las de clase B son metalo- β -lactamasas dependientes de zinc (fig. 9).

Figura 9. Clasificación de las β -lactamasas (Bush K *et al*, AAC, 2010).

Bush-Jacoby group (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros group (1995)	Molecular class (subclass)	Distinctive substrate(s)	Inhibited by		Defining characteristic(s)	Representative enzyme(s)
				CA or TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cephalosporins	No	No	Greater hydrolysis of cephalosporins than benzylpenicillin; hydrolyzes cephamycins	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cephalosporins	No	No	Increased hydrolysis of ceftazidime and often other oxyimino- β -lactams	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicillins	Yes	No	Greater hydrolysis of benzylpenicillin than cephalosporins	PC1
2b	2b	A	Penicillins, early cephalosporins	Yes	No	Similar hydrolysis of benzylpenicillin and cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	Yes	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicillins	No	No	Resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Extended-spectrum cephalosporins, monobactams	No	No	Increased hydrolysis of oxyimino- β -lactams combined with resistance to clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicillin	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicillin, cefepime	Yes	No	Increased hydrolysis of carbenicillin, cefepime, and cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacillin	Variable	No	Increased hydrolysis of cloxacillin or oxacillin	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Extended-spectrum cephalosporins	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and oxyimino- β -lactams	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenems	Variable	No	Hydrolyzes cloxacillin or oxacillin and carbapenems	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Extended-spectrum cephalosporins	Yes	No	Hydrolyzes cephalosporins. Inhibited by clavulanic acid but not aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenems	Variable	No	Increased hydrolysis of carbapenems, oxyimino- β -lactams, cephamycins	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1)	Carbapenems	No	Yes	Broad-spectrum hydrolysis including carbapenems but not monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B (B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenems	No	Yes	Preferential hydrolysis of carbapenems	CphA, Sfh-1
NI	4	Unknown					

^a CA, clavulanic acid; TZB, tazobactam.

^b NI, not included.

La adquisición de β -lactamasas plasmídicas de clase A, denominadas de amplio espectro o β -lactamasas clásicas, como TEM-1, TEM-2 y SHV-1, es responsable de la resistencia a aminopenicilinas y carboxipenicilinas y de la sensibilidad disminuida o intermedia a ureidopenicilinas. Las cepas portadoras de estas enzimas mantienen su sensibilidad a cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos.

La producción de β -lactamasas resistentes a los inhibidores derivan también de las β -lactamasas clásicas y se caracterizan por conferir resistencia a aminopenicilinas, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas; no son sensibles a la acción de los inhibidores y no tienen actividad sobre el resto de β -lactámicos. Estas β -lactamasas se denominaron originariamente IRT (inhibitor-resistant TEM mutant) porque en su mayoría derivan de TEM-1 y TEM-2. Las oxacilinasas (como la OXA-1), pertenecientes a la clase D de Ambler, dan lugar a un fenotipo indistinguible casi del de las IRT.

La hiperproducción de β -lactamasa cromosómica de clase C y las AmpC plasmídicas se caracterizan por presentar resistencia a la práctica totalidad de β -lactámicos excepto las cefalosporinas de 4ª generación y los carbapenémicos, aunque las diferentes cefalosporinas serán más o menos hidrolizadas en función del nivel de hiperproducción. Además, se caracterizan por ser inhibidas por sustancias como cloxacilina o ácido borónico y ser refractarias a la inhibición por los inhibidores clásicos.

La producción de BLEE en las bacterias gramnegativas es el mecanismo de resistencia a los β -lactámicos más común e importante. Son enzimas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico inactivando los antibióticos. Un grupo importante de estas enzimas son las BLEE que tienen capacidad de hidrolizar y causar resistencia a penicilinas, oximinocefalosporinas (cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima) y monobactámicos (aztreonam), pero no a cefamicinas (cefoxitina) ni a carbapenémicos (imipenem, doripenem, meropenem y ertapenem), siendo inhibidas por el ácido clavulánico. Los genes que las codifican se encuentran en elementos móviles que facilitan su diseminación y con frecuencia presentan co-resistencia a otros antibacterianos como aminoglucósidos, cotrimoxazol y quinolonas. Las BLEE se pueden clasificar en diferentes grupos. La mayoría de ellas pertenecen a la clase molecular A de Ambler.

Las BLEE predominantes en Europa fueron inicialmente las de tipo SHV, pero a finales de los 80 aparece una nueva familia de BLEE, las CTX-M que se ha encontrado en diferentes especies bacterianas. En la década de los 90 estas enzimas se encontraron en distintas especies de *Enterobacteriaceae* produciendo brotes nosocomiales, pero a partir del 2000 se han convertido en las más frecuentes en la mayor parte del mundo, tanto en infecciones hospitalarias como de la comunidad, habiendo casi sustituido a las BLEE de los tipos TEM y SHV.

La detección de las BLEE en el laboratorio no siempre es fácil, ya que depende de su expresión fenotípica, y esto viene condicionado por la cantidad de enzima producida por la bacteria, y de la presencia o no de otros mecanismos de resistencia. Su detección se basa en la capacidad de estas enzimas de hidrolizar las cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los monobactámicos, disminuyendo por tanto la sensibilidad de la bacteria a estos antibacterianos que se pone de manifiesto en un incremento de las CMI o una disminución de los halos de inhibición cuando se realiza la técnica de difusión con discos.

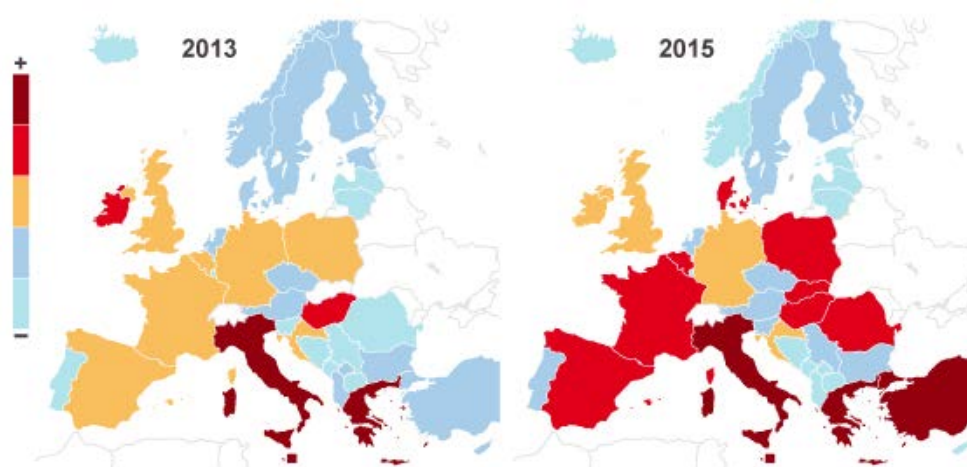
Otra de las características de estas enzimas es que son inhibidas por el ácido clavulánico y que no presentan actividad hidrolítica frente a la cefoxitina, por lo que las cepas aparecen en el antibiograma como sensibles a este antimicrobiano cuando no coexisten otros mecanismos de resistencia [97].

1.3.1.2. Resistencia a carbapenémicos

Las carbapenemasas son β -lactamasas que hidrolizan la mayor parte de β -lactámicos incluidos los carbapenémicos. En enterobacterias se han descrito las tres clases de enzimas con actividad frente a carbapenémicos, las carbapenemasas de clase A (como por ejemplo la β -lactamasa KPC), que suelen ser sensibles a la acción del ácido clavulánico, al ácido borónico y también al avibactam, y presentan una menor actividad frente a meropenem que a imipenem, las de clase B (metalo- β -lactamasas como por ejemplo las VIM o las IMP), las cuáles no presentan actividad frente a aztreonam y su acción es inhibida con EDTA o ácido dipicolínico y las de clase D, como la oxacilinasas OXA-48, que es inhibida únicamente hasta la fecha por avibactam.

Las enterobacterias productoras de carbapenemasas están sufriendo un alarmante aumento en los últimos años. Especialmente preocupante es el caso de los aislados productores de *bla*_{OXA-48} (fig. 10).

Figura 10. Mapa europeo del aumento de la incidencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (<http://www.eurosurveillance.org/>).



Las carbapenemasas de clase A (grupo 2f), poseen un fenotipo con pérdida marcada de sensibilidad a los carbapenémicos y un perfil hidrolítico que incluye el aztreonam y en menor medida o inexistente a las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. No son inhibidas por el EDTA pero como peculiaridad destaca la inhibición parcial por ácido clavulánico (mejor con tazobactam). Otras enzimas relacionadas son las de los grupos IMI encontradas inicialmente en diferentes especies del género *Enterobacter*. No obstante, dentro de las carbapenemasas de clase A, las que mayor importancia epidemiológica tienen son las denominadas KPC que reciben este nombre por haberse encontrado inicialmente en *K. pneumoniae* (KPC = *K. pneumoniae carbapenemases*). La primera de estas enzimas se describió en los Estados Unidos en 1996. En España su aparición ha sido más tardía y no está ligada al clon ST258 [98].

Las metalo- β -lactamasas tienen un perfil hidrolítico que incluye todos los antibióticos β -lactámicos con la excepción del aztreonam y no se inhiben por el ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam. Sin embargo se inhiben por agentes quelantes de cationes divalentes como el EDTA, compuestos tiólicos como el ácido 2-mercaptopropiónico, o el ácido dipicolínico. Con características similares se han descrito con posterioridad enzimas de los grupos SPM, GIM, SIM, AIM, DIM y KHM, y más recientemente la enzima NDM [99]. En España se han descrito tanto enzimas del tipo IMP, en *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, como del tipo VIM en diferentes enterobacterias, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*, siendo relevantes algunos brotes epidémicos descritos que demostraron en el estudio de la estructura poblacional la implicación de diferentes clones de *K. pneumoniae*, *E. coli* y *E. cloacae* [100].

En el grupo de las OXA (clase D de Ambler y 2df de Bush y Jacoby) también se encuentran variantes que hidrolizan los carbapenémicos. Entre ellas destacan las variantes de los subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143, OXA-237 y, en menor medida, OXA-51 descritas en *Acinetobacter* spp. y sobre todo la OXA-48 descrita en enterobacterias en países del entorno mediterráneo [101-102]. La detección fenotípica de OXA-48 es compleja ya que la hidrólisis de los carbapenémicos es poco eficiente y prácticamente inexistente para las cefalosporinas de tercera y cuarta generación. El perfil de sensibilidad que confieren mantiene las características generales de las OXA al ser poco inhibida por el ácido clavulánico, sulbactam o tazobactam. Por ello, en un antibiograma

habitual de *K. pneumoniae* o *E. coli*, enterobacterias en las que mayoritariamente se ha encontrado la OXA-48, se mostrarían resistentes a las penicilinas y sus asociaciones con los inhibidores de β -lactamasas de clase A, serían sensibles a las cefalosporinas y mostrarían pérdida de sensibilidad a los carbapenémicos [97].

1.3.1.3. Resistencia a quinolonas

Las quinolonas son un grupo de antimicrobianos sintéticos, de las cuales cabe destacar el ácido nalidíxico y las quinolonas fluoradas, como norfloxacin, ciprofloxacino, ofloxacino y levofloxacino, cuyo espectro de actividad se centra en las bacterias gramnegativas pero que ha ido ampliándose sobre grampositivos, anaerobios e incluso micobacterias con las nuevas fluoroquinolonas como moxifloxacino [103]. La actividad antimicrobiana de las fluoroquinolonas se basa en la inhibición de las topoisomerasas, la topoisomerasa II o ADN girasa y la topoisomerasa IV. Ambas son enzimas tetraméricas formadas por 2 subunidades, A y B, codificadas respectivamente por los genes *gyrA* y *gyrB* en la ADN girasa y *parC* y *parE* en la topoisomerasa IV [104,105].

Los principales mecanismos de resistencia descritos son consecuencia de mutaciones en los genes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV; mutaciones que afectan a la expresión de las porinas o el lipopolisacárido, impidiendo la penetración del antimicrobiano al interior de la bacteria; y/o la presencia de bombas de expulsión que expulsan el antimicrobiano hacia su exterior. Hasta 1998 todos los mecanismos de resistencia a quinolonas eran cromosómicos. Sin embargo, en los últimos años se describen con mayor frecuencia PMQR [106,107]. Se han descrito tres determinantes plasmídicos asociados a resistencia: las proteínas *Qnr*, que protegen la diana de la quinolona, las bombas de expulsión activa *OqxAB* y *QepA* y la enzima *AAC(6')-Ib-cr* que acetila ciprofloxacino y norfloxacino [107].

La expresión aislada de un mecanismo de PMQR puede conllevar una disminución de la sensibilidad a fluoroquinolonas, en ausencia de resistencia a ácido nalidíxico. Existe un riesgo elevado de selección de mutantes con alto nivel de resistencia en este tipo de cepas [108-109]. Además la asociación entre resistencia a fluoroquinolonas y resistencia

a otros antibióticos, especialmente β -lactámicos y aminoglicósidos, es un problema emergente en el manejo de este tipo de infecciones [110-111].

1.4. El MALDI-TOF MS en la determinación de resistencias a antibióticos.

Como ya hemos comentado anteriormente en esta introducción, el MALDI-TOF MS se ha establecido en los últimos años como una herramienta diagnóstica de primera línea en la identificación de patógenos infecciosos. Otras líneas que se han ido desarrollando posteriormente también con éxito, son la tipificación bacteriana y la detección de resistencias antimicrobianas.

La principal ventaja de la tecnología MALDI-TOF MS para la detección de resistencias es la obtención de resultados 24 h antes que los métodos fenotípicos, incluyendo los automatizados, con unos valores de sensibilidad y especificidad comparables a los métodos moleculares. Además aunque los costes iniciales en la tecnología son altos, el coste por determinación es muy inferior a los métodos fenotípicos, bioquímicos o moleculares. Además la técnica es fácil de realizar y la automatización creciente del proceso está facilitando su implementación en la rutina de los laboratorios de microbiología clínica.

A continuación detallaremos los hallazgos más relevantes en este campo.

1.4.1. Detección directa de resistencias a través de la actividad enzimática.

Los ensayos basados en la monitorización directa de la actividad enzimática sobre el antibiótico β -lactámico es el punto de partida de todos los ensayos sobre detección de resistencias a través de MALDI-TOF MS. Los antibióticos β -lactámicos son inactivados por la hidrólisis del enlace amida en el anillo β -lactámico, mediada por una molécula de agua. Esta molécula de agua, se añade a la nueva estructura formada, dando lugar a un incremento del peso molecular en 18 Da. Este cambio de masa es lo que diferencia los aislados sensibles de los resistentes y permite que sea monitorizado por MALDI-TOF MS. Además de la reacción de hidrólisis, tienen lugar reacciones espontáneas, como la descarboxilación, y la captación de iones de la matriz (Na y K), dando lugar a nuevos

cambios de masa. Los espectros proporcionados por el MALDI-TOF MS son una combinación de la relación relativa de intensidades de los diferentes picos de masas. Los patrones de picos de masa, son únicos para cada antibiótico y pueden ser utilizados para diferenciarlos.

La detección directa de la actividad β -lactamasa se realiza de forma muy similar en todos los trabajos publicados. Un cultivo bacteriano fresco se suspende sobre un buffer de antibiótico y se incuba a 37°C bajo agitación. Una vez finalizado el tiempo de incubación, la mezcla se centrifuga y el sobrenadante se mide bajo la acción de una matriz adecuada. Después, podremos analizar el espectro obtenido.

1.4.1.1. Detección de la actividad β -lactamasa

El estudio que establece las bases de la detección directa de la resistencia a antibióticos β -lactámicos fue publicada por Sparbier *et al* [112]. Incluye la descripción espectrofotométrica de ampicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, imipenem y meropenem y sus productos de hidrólisis (fig. 11). El perfil de los picos de masas de estas moléculas antes y después de la hidrólisis es lo suficientemente diferente en todos los casos para discriminar entre aislados sensibles y resistentes. El tiempo de incubación para los aislados fue de 3 horas. Los espectros se calibraron con un estándar interno que consiste en bradiquinina (1-5) y bradiquinina (1-7) (Sigma-Aldrich, Alemania) más la matriz, HCCA. Introduce también la posibilidad de utilizar inhibidores en la reacción (ácido clavulánico, tazobactam y ácido 3-aminofenilborónico) para identificar la clase de β -lactamasa y su futura aplicabilidad sobre muestras clínicas como los hemocultivos.

Figura 11. Masas correspondientes a los antibióticos ampicilina, piperacilina, cefotaxima, ceftazidima, ertapenem, meropenem e imipenem y sus correspondientes metabolitos hidrolizados. (Sparbier K *et al*, JCM, 2014)

Antibiotic	Mol wt (g/mol)	Sensitivity pattern (Da)							Resistance pattern (Da)								
		[M + H] ⁺	[M + Na] ⁺	[M + K] ⁺	[M + 2 Na] ⁺	[M + Na + K] ⁺	[M + 3 Na] ⁺	[M-X ^a + H] ⁺	[M _{hyd.} + H] ⁺	[M _{hyd.} + Na] ⁺	[M _{hyd.} + 2 Na] ⁺	[M _{hyd.} + Na + K] ⁺	[M _{hyd./decarb.} + H] ⁺	[M _{hyd.-X + H}] ⁺	[M _{hyd./decarb.-X + H}] ⁺	[M _{hyd./decarb.} + Na] ⁺	[M _{hyd./decarb.} + K] ⁺
Ampicillin	349.4	350.4	372.4		394.4				368.4	390.4	412.4		324.4				
Piperacillin	517.5	518.5	540.5		562.5				536.5	558.5	580.5		(492.5)				
Cefotaxime	455.5	456.5	478.5					396.5						414.5	370.5		
Ceftazidime	546.6	547.6						468.6						486.6	442.6		
Ertapenem	475.5	476.5	498.5	514.5	520.5	536.5	542.5		494.5	516.5	538.5	554.5	450.5			472.5	488.5
Imipenem	299.4	300.4															
Meropenem	383.4	384.5	406.5		428.5												

^a X, acetyl for cefotaxime and pyridine for ceftazidime.

Jung J. *et al* validó un procedimiento utilizando 100 hemocultivos para detectar la resistencia a cefalosporinas de 3ª generación en *Enterobacteriaceae* y para la resistencia a aminopeniclinas en *E. coli* [113]. Se utilizó para ello la cefotaxima y la ampicilina. El tiempo de incubación se estableció en 90 min. Para el análisis de datos se utilizó un programa automatizado *ad hoc*. Los resultados se exponen en un diagrama de cajas con el cálculo del valor logRQ, o ratio de hidrólisis, entre la forma hidrolizada y sin hidrolizar.

Las limitaciones fundamentales para la detección de la actividad β-lactamasa mediante MALDI-TOF MS, es la elección de un antibiótico universal marcador de la resistencia, la disminución del tiempo de reacción que está entre 90 y 180 min según el tipo de antibiótico utilizado y el uso de un programa automatizado para la interpretación de espectros que facilite la implementación clínica de la técnica.

1.4.1.2. Detección de la actividad carbapenemasa

Hrabak *et al* utilizan una serie de 124 cepas incluyendo *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* para detectar la resistencia a carbapenems utilizando meropenem como indicador [114]. Las enzimas carbapenemasas representados son IMP, VIM, NDM y KPC. Las bacterias se incubaron durante 3 h en un buffer con una solución de meropenem y se utilizó DHB para facilitar la detección de los productos de hidrólisis. Sin embargo la utilización de DHB como matriz, da lugar a unas preparaciones heterogéneas,

complicando la adquisición automática del espectro [115]. Este ensayo ha sido mejorado en dos ocasiones, la primera con la adición del 0.01% de SDS que permite disminuir la concentración de bacteria [116] y con la modificación del buffer de reacción, incorporando NH_4HCO_3 , que permite la detección de los productos de degradación producidos por aislados portadores de OXA-48 sin disminuir la sensibilidad en la detección del resto de enzimas [117].

Burckhardt *et al* utilizaron una incubación con ertapenem para detectar la resistencia a carbapenémicos [118]. Los aislados portaban enzimas de tipo NDM-1, VIM-1, VIM-2, KPC-2 y IMP. Se estableció una incubación de 1 a 2.5 h. Johansson *et al* emplearon también el ertapenem para detectar la resistencia a carbapenémicos en *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* con tiempos de reacción desde 15 min para aislados de tipo KPC a 120 min para las metalo- β -lactamasas [119]. Los aislados de OXA-48 necesitaron una incubación prolongada de 24 h para hidrolizar el ertapenem.

Kempf *et al* utilizaron el imipenem como un indicador de la resistencia a carbapenémicos en 106 aislados de *A. baumannii* [120]. Se calcula el ratio de hidrólisis del imipenem después de un tiempo de incubación de 4 horas con excelentes valores de sensibilidad y especificidad (100%). Sauget *et al* detectaron aislados productores de OXA-48 en una incubación de 90 min con imipenem en una serie de 372 aislados [121], utilizando una ligera modificación en la metodología descrita por Kempf *et al*. Un ensayo de 30 min para imipenem en *Enterobacteriaceae* es descrito por Laserre *et al* sobre un total de 223 aislados [122]. Se utilizó un ratio ≥ 0.82 para clasificar los aislados entre sensibles y resistentes con un 99% de sensibilidad y un 100% de especificidad.

Monteferrante *et al*. [123] intentaron estandarizar el método de detección de carbapenemasas. Para ello compararon una serie de parámetros, como el antibiótico utilizado, ertapenem e imipenem, el uso de un inóculo bacteriano constante en el ensayo y la posibilidad de realizar un paso de lisis bacteriana. El uso de imipenem como antibiótico marcador de la resistencia, el ajuste a un 3.0 McFarland del inóculo antes de comenzar el ensayo y la introducción de un paso previo de lisis bacteriana, con el agente B-PER II (Thermo Fischer Scientific) condujeron a un 100% de sensibilidad y especificidad de los resultados (fig. 12).

Figura 12. Porcentaje de hidrólisis de una serie de bacilos Gram negativos en función de su mecanismo de resistencia y de la realización o no de un paso de extracción previo. (Monteferrante CG *et al*, JAC, 2016)

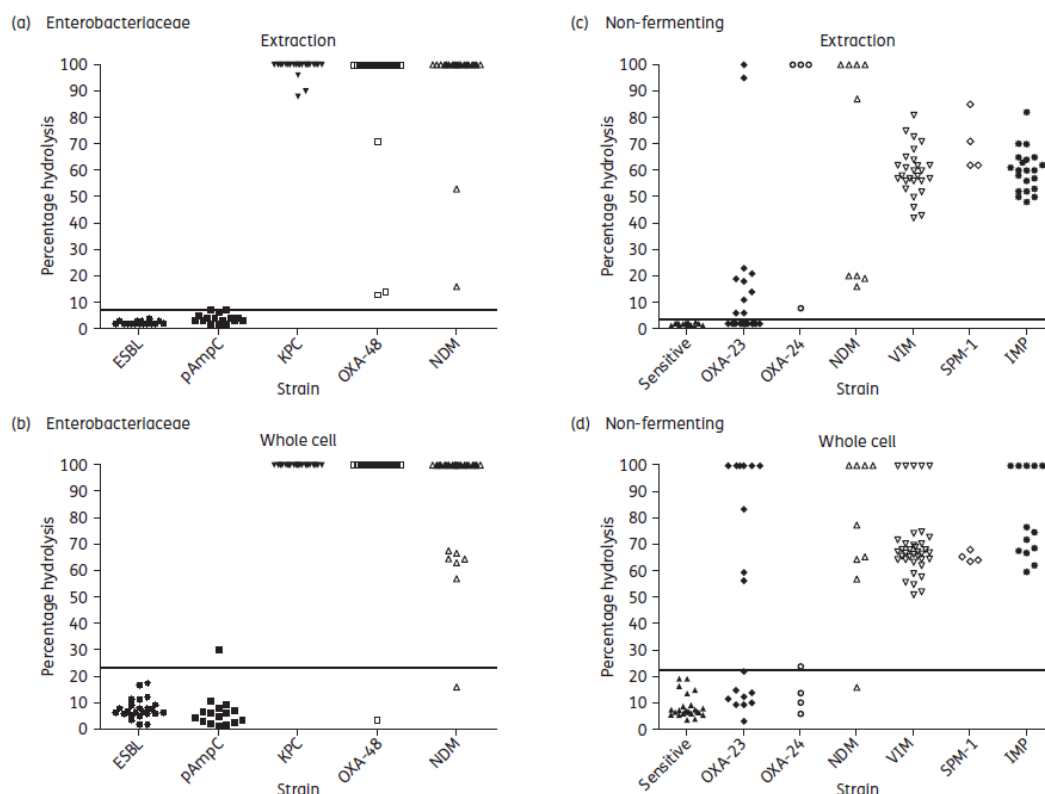


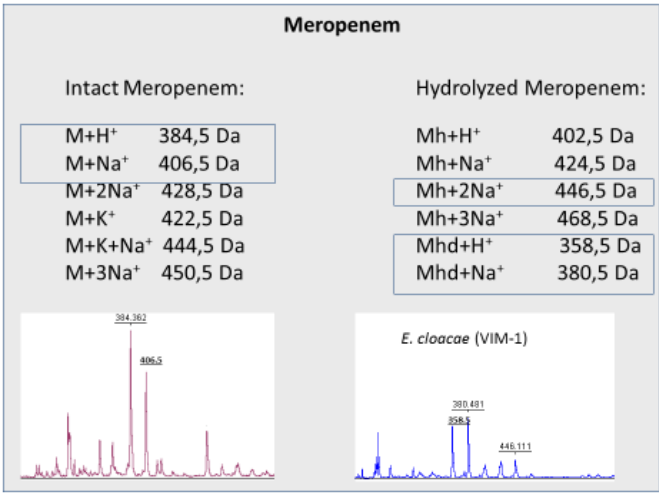
Figure 7. Percentage hydrolysis of various strains. (a) Enterobacteriaceae, extraction method. (b) Enterobacteriaceae, whole-cell method. (c) Non-fermenting strains, extraction method. (d) Non-fermenting strains, whole-cell method. The horizontal line represents the cut-off level, calculated as average of controls + 3 × SD.

El método MALDI-TOF MS para la detección de la actividad hidrolítica ha sido aplicado para diferentes antibióticos y una amplia variedad de microorganismos como *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* portadores de diferentes tipos de β -lactamasas. La metodología utilizada es bastante similar en todos los ensayos, habiendo pequeñas variaciones como la posibilidad de introducir un paso previo de lisis en el protocolo [116-124] y la utilización de diferentes buffers de reacción, desde agua hasta hidrógeno citrato de sodio [112], Tris-HCl [114] y bicarbonato de amonio [117]. Los hemocultivos también se han testado con excelentes resultados, aplicando un procedimiento de extracción proteica (Sepsityper Kit, Bruker Daltonik GmbH Germany) para obtener un pellet bacteriano, sobre el que llevar a cabo el ensayo de hidrólisis. Sin

embargo, aún se necesita una estandarización del proceso, con el uso de una metodología universal, no dependiente del microorganismo, con un único antibiótico marcador para la detección de la resistencia y un programa automatizado que facilite la interpretación de los espectros, para que la determinación de la resistencia al igual que la identificación se pueda convertir en una técnica de rutina en los laboratorios de microbiología clínica.

El ensayo MALDI-TOF MS para la detección directa de la actividad β -lactamasa es una herramienta con un gran potencial para convertirse en un método de rutina en los laboratorios de microbiología clínica, con numerosos estudios validados y listos para la implementación clínica [125] (fig. 13). Además es un método que aporta ventajas como la rapidez y la sencillez del ensayo.

Figura 13. Espectro del Meropenem después de la hidrólisis con una carbapenemasa de tipo VIM-1.



1.4.1.3. Detección de enzimas modificantes de aminoglucósidos

Zimmermann *et al* desarrollaron un método para detectar resistencia a aminoglucósidos en bacilos gramnegativos mediada por N-acetiltransferasas en menos de 3 h mediante LC-ESI-TOF, pero no pudo detectarse mediante MALDI-TOF MS [126]. Los aislados habían sido previamente caracterizados con el gen de resistencia AAC-6'. No se han realizado más ensayos considerando la resistencia a aminoglucósidos, por lo que sería necesario investigaciones más exhaustivas.

1.4.2. Detección de la resistencia a través del perfil proteico bacteriano

Esta aplicación de MALDI-TOF MS se basa en la diferenciación de los microorganismos sensibles y resistentes de una misma especie a través de sus espectros, ya que la presencia de genes responsables de la resistencia se refleja en la expresión de proteínas produciéndose picos característicos en el espectro. Se ha utilizado con éxito en algunos estudios, aunque en general no están lo suficientemente optimizados y validados, no siendo aptos por el momento para realizar en la mayoría de los laboratorios clínicos.

1.4.2.1. Detección de *S. aureus* resistente a meticilina (SARM)

Con este fundamento se ha estudiado la capacidad de MALDI-TOF MS para detectar SARM, con resultados muy diferentes de un estudio a otro, no concluyentes y que son más útiles para caracterizar clonalmente cepas de *S. aureus* en brotes nosocomiales, que para la detección de la resistencia a meticilina [127-131].

Josten M *et al* detectan un pequeño péptido denominado PSM-mec excretado por las cepas *agr* positivas de SARM que se puede detectar mediante EM a una m/z de 2415 Da [132]. En esta línea Rhoads DD *et al* realizan un ensayo sobre *S. aureus* para detectar la resistencia a meticilina utilizando como marcador el pico de masas anteriormente descrito (fig. 14). Concluyen que el ensayo tiene una sensibilidad del 40% para la detección de SARM con una especificidad del 100% [133]. La detección de este pico de masas puede realizarse en la rutina sin coste, ni tiempo adicional para la identificación, convirtiéndose en uno de los mayores avances en la detección de SARM.

Figura 14. Espectro de *S. aureus* resistente a la meticilina con el gen *mecA* (arriba) con el pico de masa a 2415 Da frente a un *S. aureus* sensible a meticilina.

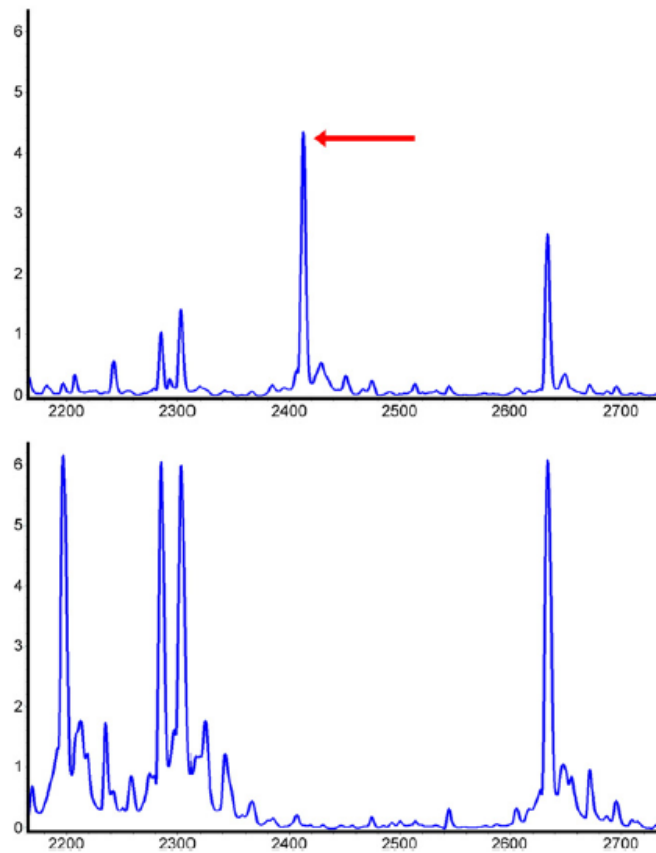


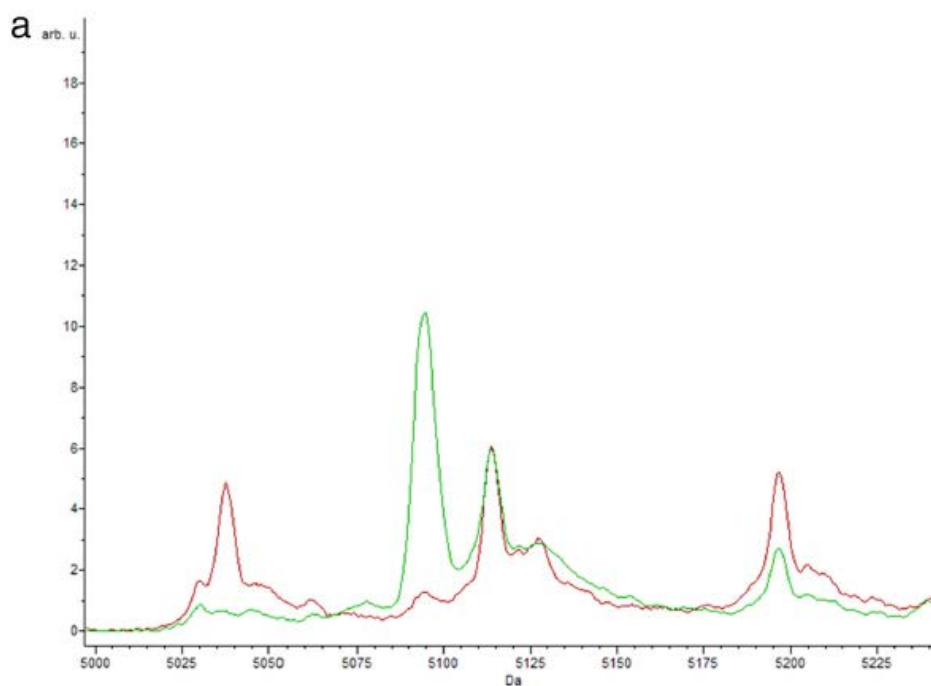
Fig. 3. MALDI-TOF mass spectra from 2 methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains obtained using Bruker Biotyper are depicted. One strain is an USA100 strain (top), and the other strain is an USA300 strain (bottom). The USA100 strain has the class A *mec* gene complex with the PSM-*mec* peak near 2415 *m/z* (arrow), and the USA300 strain lacks the class A *mec* gene complex and PSM-*mec*. The x-axis depicts mass-charge, and the y-axis is arbitrary units $\times 10^4$. This figure was modified from flexAnalysis screen captures. The original screen captures (Figs. S4 and S5) and additional screen captures (Figs. S6 and S7) are available.

1.4.2.2. Detección de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina

Griffin *et al* describen la diferenciación de *E. faecium* portador del gen *vanB*, responsable de la resistencia a glicopéptidos, a partir de la creación de un modelo estadístico basado en los espectros obtenidos tras extracción con ácido fórmico [134] (fig. 15). La validación prospectiva de los resultados demostró una sensibilidad y especificidad del 96.7% y 98.1%, respectivamente. Más recientemente, Nakano *et al* han evaluado la capacidad de MALDI-TOF MS para diferenciar de *E. faecium* *vanA*-positivo (61 aislamientos) de *E. faecium* *vanA*-negativo (71 aislamientos) utilizando para analizar los espectros tres algoritmos diferentes de ClinProTools v.2.2., obteniendo una sensibilidad y especificidad

superiores al 90% [135]. Los aislamientos pertenecen a la misma área geográfica, por lo que podrían estar relacionados clonalmente, condicionando los resultados obtenidos.

Figura 15. Espectro de *E. faecium* VanB positivo (verde) frente a VanB negativo (rojo) (Griffin PM *et al*, JCM, 2012).



1.4.2.3. Detección de *Bacteroides fragilis* portador del gen *cfiA*

Wybo *et al* consiguieron diferenciar 248 cepas clínicas que se agruparon en dos cluster bien diferenciados (uno con el gen *cfiA*, codificante para carbapenemasas, y el otro no) en un dendrograma, calculado a partir de sus perfiles proteicos [136] (fig. 16). Nagy *et al* utilizando 28 cepas (9 portadoras del gen *cfiA* y 19 no portadoras), validaron un método basado en la presencia o ausencia de una serie de picos en el espectro obtenido por MALDI-TOF MS en el intervalo 4000-5500 Da, consiguiendo una precisión del 100% [137]. Johansson *et al* aplicaron con éxito esta metodología para detectar la presencia de *B. fragilis* portador del gen *cfiA* directamente a partir de hemocultivos [138]. Estos resultados sugieren que MALDI-TOF MS puede ser una herramienta útil para la rápida detección de este mecanismo de resistencia en cepas de *B. fragilis*.

Figura 16. Matriz de correlación para diferenciar *B. fragilis* *cfiA* positivos de negativos. (Wybo I. *et al*, JCM, 2011).

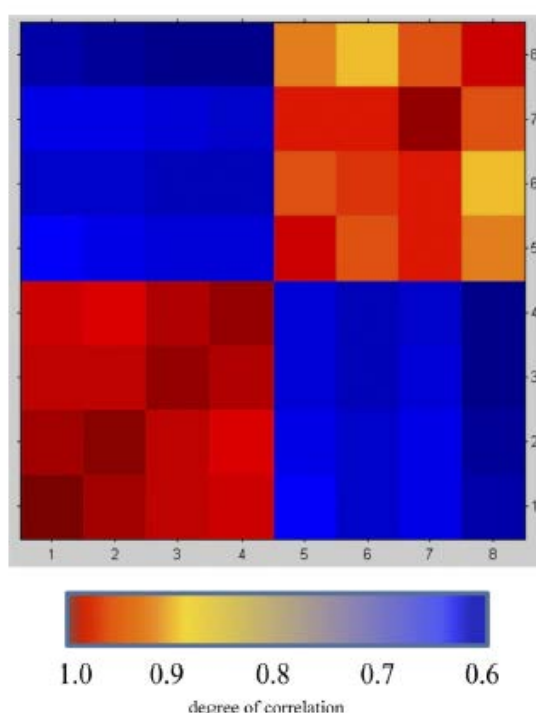


FIG. 1. The composite correlation index (CCI) values between *cfiA*-positive (1 to 4) and *cfiA*-negative (5 to 8) isolates were higher than CCI values if *cfiA*-positive isolates were compared with *cfiA*-negative isolates.

1.4.2.4. Detección directa de β -lactamasas

La detección directa de β -lactamasas en cepas de *E. coli* resistentes a ampicilina por medio de la tecnología MALDI-TOF MS fue realizada por primera vez por Camara *et al* [139], que consiguieron identificar en el espectro de extractos proteicos obtenidos a partir cultivos bacterianos en caldo un pico de aproximadamente 29kDa específico de la β -lactamasa. Sin embargo, Schaumann *et al* no pudieron diferenciar de manera fiable aislamientos de *Enterobacteriaceae* y *P. aeruginosa* productores y no productores de β -lactamasas [140], aplicando el mismo protocolo utilizado para identificación bacteriana, en un intento de integrar el screening de estas enzimas en el flujo de trabajo de rutina. Más recientemente Papagiannitsisi *et al* han detectado en los espectros obtenidos a partir de extractos proteicos periplásmicos de *Enterobacteriaceae* productoras de cefalosporinasa tipo CMY-2 un pico específico de 39,850 kDa, en un ensayo que podría tener potencial para detectar otras β -lactamasas de tipo AmpC [141].

1.4.2.5. Detección de *K. pneumoniae* con pérdida de porina OmpK36

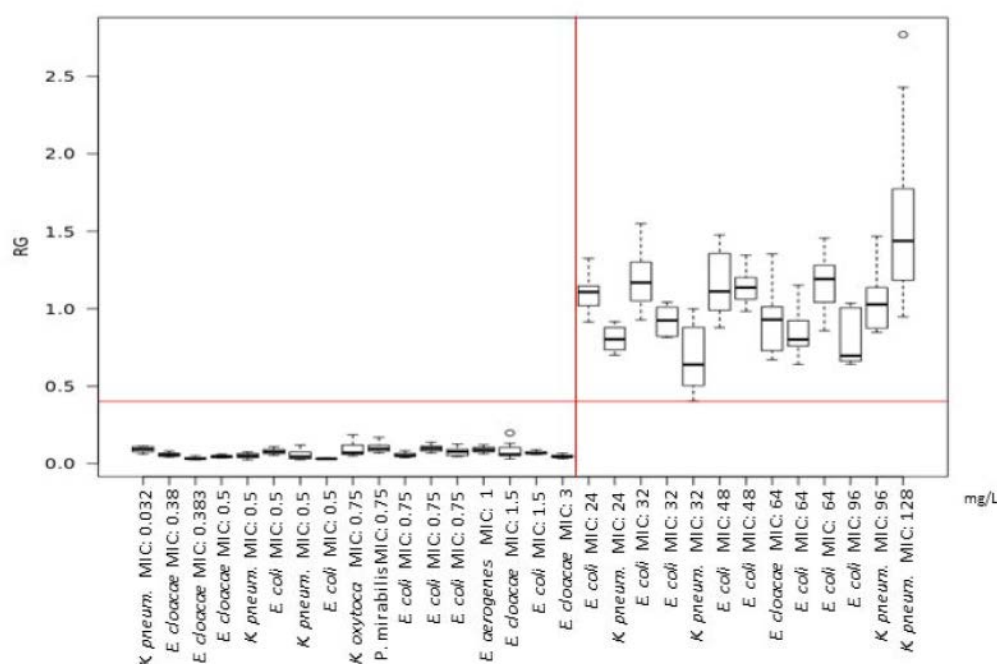
La pérdida o expresión reducida de la porina OmpK36 en *K. pneumoniae* puede tener un papel importante en la resistencia a carbapenemes. Cai *et al* investigaron mediante MALDI-TOF MS la pérdida de esta proteína en ocho aislamientos de *K. pneumoniae* y un aislamiento de *K. oxytoca* resistentes a carbapenemes, identificando dos picos, de 38.000 Da y 19.000 Da como indicadores de la presencia de la porina OmpK36 [142]. Los autores concluyen que es necesario estudiar más cepas para establecer la robustez del análisis y validar este método.

1.4.3. Detección de la resistencia a través de la medida de los efectos antibióticos ejercidos sobre la bacteria.

1.4.3.1. Perfil de resistencia cuantitativo

Se trata de un ensayo basado en la comparación de los espectros derivados de aislados bacterianos idénticos cultivados en la presencia y ausencia de un antibiótico. Lange *et al* describió este ensayo por primera vez relacionando las intensidades de los picos con el crecimiento bacteriano en presencia de un antibiótico [143]. Los aislados resistentes presentan el mismo espectro antes y después de la incubación con el antibiótico, presentando un crecimiento relativo de 1. Los aislados sensibles, muestran un descenso en las intensidades del patrón de picos de masas, siendo el crecimiento relativo sobre 0.4. El método está optimizado para la detección de la resistencia al meropenem en *Klebsiella sp.* con un tiempo de incubación de 2 h. La mayoría de las cepas analizadas eran del tipo KPC, y no se encontraron resultados positivos para los aislados de tipo OXA-48. Es un método prometedor ya que proporciona una evaluación automática de los espectros y puede ser en principio universalmente aplicable. Jung J *et al* [144] continuó con el desarrollo de este ensayo aplicándolo directamente sobre hemocultivos estudiando la resistencia a los antibióticos piperacilina-tazobactam, cefotaxima, gentamicina y ciprofloxacino (fig. 17). La identificación de la bacteria y la susceptibilidad antibiótica es posible en un tiempo de unas 4 horas desde que el hemocultivo es positivo.

Figura 17. Determinación de la resistencia a gentamicina, midiendo el crecimiento relativo de una serie de aislados después de una incubación de 3 h. (Jung J. *et al*, JCM, 2016).



1.4.3.2. Perfiles de resistencia en levaduras

Marinach C. *et al* monitorizó el proteoma de *Candida albicans* en la presencia de diferentes concentraciones de fluconazol, con un tiempo de incubación de 15 h. Los espectros de las levaduras se adquirieron para diferentes niveles de antibióticos [145]. La concentración más baja a la que se detecta un cambio en el perfil del espectro, se define como MPCC. La comparación de las MPCCs con la CMI determinada por el CLSI reveló un alto nivel de concordancia. De Carolis E. *et al* [146] aplicó la misma metodología con algunas modificaciones a *Candida* y *Aspergillus sp.* para testar la susceptibilidad a caspofungina. Los aislados con el antifúngico se incubaron durante 15 h. Para analizar los resultados, se utilizó el CCI como herramienta estadística. Esta herramienta dispone los resultados en forma de una matriz, en la que cada espectro obtenido para cada concentración se compara con las concentraciones máxima y mínima. Los valores de CCI van desde 0 indicando que los espectros son totalmente

diferentes hasta 1 que indicaría la máxima similitud. Esta matriz, permite la determinación de la MCC para caspofungina de todos los aislados. Vella *et al* demostraron que el tiempo de reacción podía reducirse hasta 3 horas [147]. Para ello los aislados se incubaron a 3 concentraciones diferentes, sin antifúngico, en la concentración del punto de corte y a concentración máxima. Se comparó el espectro obtenido en el punto de corte con los obtenidos sin antifúngico y con la concentración máxima de éste. El análisis informático se realizó a través del análisis de correlación. Saracli MA *et al* describen la detección de la resistencia a los triazoles (fluconazol, voriconazol y posaconazol) entre *Candida sp.* a través de MALDI-TOF MS [148]. Para ello incuban los aislados durante 16 h a tres concentraciones diferentes, sin antifúngico, en la concentración del punto de corte clínico por CLSI o punto de corte epidemiológico y a concentración máxima. De nuevo se utilizan los valores CCI para calificar los aislados como sensibles o resistentes. Los valores de sensibilidad comparados con el método CLSI para la determinación de la susceptibilidad a antifúngicos varían entre un 54% y un 97%, y la reproducibilidad del ensayo entre el 54% y el 83% para las distintas especies.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El objetivo de esta tesis es el desarrollo de métodos rápidos proteómicos para la detección de bacterias resistentes a los antibióticos, mediante el uso del MALDI-TOF MS. El uso de esta tecnología para la determinación de resistencias está aún en una fase inicial de desarrollo, por lo que queremos contribuir a la mejora y estandarización de estas técnicas para su posible implementación en la práctica asistencial.

La expansión de las resistencias antibióticas, junto con el escaso desarrollo de nuevos antimicrobianos, hace que la búsqueda de nuevas estrategias para detectar y controlar de forma rápida las bacterias resistentes a los antibióticos, sea un objetivo de máxima importancia para los microbiólogos.

Con este propósito, hemos intentado buscar nuevas aplicaciones que permitan la detección rápida de resistencias bacterianas de un modo coste-efectivo para los laboratorios de microbiología clínica. En esta línea hemos apostado por la tecnología MALDI-TOF MS, por ser una tecnología reciente y con grandes posibilidades de expansión, y que además está siendo implantada ya en prácticamente todos los laboratorios de microbiología clínica. Si bien es cierto, que su principal aplicación es la identificación bacteriana, hemos comprobado que son más sus posibles aplicaciones.

La gran ventaja de la tecnología MALDI-TOF MS es que ya está disponible en los laboratorios, por lo que no habría que hacer un gasto extra en tecnología, sino que es posible aplicar el mismo equipo para más de un uso. La metodología es fácil de realizar, la susceptibilidad antibiótica se obtiene rápidamente, pudiendo aplicarse como una técnica rápida, tiene grandes posibilidades de automatización y además presenta unos valores de sensibilidad y especificidad comparables a los métodos moleculares. En la actualidad existen grandes limitaciones en la aplicación de estas técnicas, como la estandarización y simplificación de la metodología, la aplicación en muestras clínicas y la interpretación de los resultados.

En esta tesis, he pretendido desarrollar métodos rápidos, fáciles de aplicar, al alcance de cualquier laboratorio asistencial y con gran impacto clínico que resuelvan las limitaciones anteriores y expandan el uso de esta metodología. Nos centraremos

fundamentalmente, en poder detectar los mecanismos de resistencias más frecuentes en bacilos Gram negativos, especialmente en *Enterobacteriaceae*.

2.2. Objetivos específicos

I. Detección de β -lactamasas de espectro extendido BLEE en *Enterobacteriaceae* directamente de hemocultivos.

Las enzimas β -lactamasas ejercen un efecto hidrolítico sobre el anillo β -lactámico del antibiótico alterando su estructura e incrementando la masa del mismo en 18 Da. Las bacterias susceptibles y que por tanto no porten ningún mecanismo de resistencia, no producirán ningún cambio en el antibiótico, por lo que éste se mantendrá intacto, observándose el mismo espectro de masas. Por el contrario, en las bacterias portadoras de una enzima β -lactamasa se producirá un cambio detectable en el espectro. Para evaluar la aplicabilidad de esta técnica, se estudió el seguimiento de esta reacción mediante MALDI-TOF MS sobre una serie de aislados clínicos portadores de distintas enzimas β -lactamasas directamente desde el hemocultivo. Se evaluó el tiempo de reacción en función del antibiótico marcador utilizado para detectar la resistencia y del mecanismo de resistencia implicado. Se valoró también la utilidad de emplear un inhibidor de la reacción, el ácido clavulánico, para confirmar la presencia de aislados portadores de BLEE.

II. Detección rápida de *Enterobacteriaceae* productoras de OXA-48 mediante MALDI-TOF MS.

Los aislados productores de *bla*_{OXA-48} se caracterizan por poseer CMI bajas a los antibióticos carbapenémicos, por lo que son difícilmente detectables por la mayor parte de métodos fenotípicos. La necesidad de un método con alta sensibilidad y especificidad para la detección de estos aislados y con posible implementación clínica condujo al desarrollo de este trabajo. Se evaluó la capacidad del MALDI-TOF MS para detectar carbapenemasas, con especial énfasis en la detección de enzimas de tipo OXA-48, utilizando el ertapenem como antibiótico marcador de la resistencia. Además, se valoró la introducción de un

nuevo antibiótico en EM, la temocilina, como marcador de resistencia de estas enzimas.

III. Desarrollo de un protocolo universal para la detección rápida y automatizada de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas directamente de hemocultivos mediante MALDI-TOF MS.

La detección de aislados productores de carbapenemasas directamente desde el hemocultivo era un objetivo de máximo interés clínico. La existencia de distintos protocolos para esta determinación con resultados no demasiado prometedores, nos llevó al objetivo de este trabajo que fue el desarrollar una metodología universal para bacilos Gram negativos con un procesamiento automatizado de los resultados obtenidos de los espectros de masas, proporcionando un resultado de susceptibilidad antibiótica a antibióticos carbapenémicos, sin necesidad de interpretación visual del espectro.

IV. Detección de la actividad carbapenemasa en *Enterobacteriaceae* y *A. baumannii* a través de la combinación de imipenem-avibactam mediante MALDI-TOF MS.

La acción inhibitoria de ciertos compuestos frente a los antibióticos β -lactámicos, como el avibactam es bien conocida. La ceftazidima-avibactam, ha demostrado una fuerte actividad inhibitoria sobre *Enterobacteriaceae* productora de β -lactamasas de clase A y C y también en menor medida sobre clase D. En este trabajo nuestro objetivo es evaluar si la combinación imipenem-avibactam es útil para detectar carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS. Para ello utilizamos una serie de aislados clínicos productores de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* y *A. baumannii*.

V. Detección rápida del determinante de resistencia AAC(6')-Ib-cr mediado por plásmidos en *Enterobacteriaceae* a través de MALDI-TOF MS.

El objetivo de este trabajo fue evaluar si la tecnología MALDI-TOF MS es capaz de detectar otros mecanismos de resistencia enzimáticos que no sean hidrolíticos como los producidos por enzimas β -lactamasas. Para ello nos propusimos demostrar la detección de la actividad acetilasa de la enzima

AAC(6')-Ib-cr sobre ciprofloxacino y norfloxacino en una serie de aislados clínicos, siguiendo mediante EM la reacción de acetilación que incrementa la masa molecular del antibiótico en 43 Da.

3. CAPÍTULOS

CAPÍTULO 3.1.

Artículo 1. Detección rápida de *Enterobacteriaceae* productoras de β -lactamasas de espectro extendido directamente sobre hemocultivos mediante Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

En los bacilos Gram negativos, especialmente en *Enterobacteriaceae*, la resistencia conferida por las β -lactamasas de espectro extendido (BLEEs) es el tipo más prevalente de resistencia a β -lactámicos. En concreto, la familia de enzimas de tipo CTX-M, se ha convertido en la más prevalente en el mundo, reemplazando a las enzimas de tipo TEM y SHV. Este problema se ha convertido en un reto para los microbiólogos, que se han propuesto el desarrollo de nuevos métodos para detectar este tipo de resistencia lo antes posible y poder adecuar la terapia antibiótica que se va a administrar.

El MALDI-TOF MS ha comenzado a utilizarse como una nueva herramienta para detectar la resistencia antibiótica, monitorizando los espectros de masas de los antibióticos objeto de estudio. En el caso de las enzimas β -lactamasas, éstas ejercerán un efecto hidrolítico sobre el anillo β -lactámico del antibiótico, alterando su estructura e incrementándose la masa del mismo en 18 Da. Este cambio de masas del antibiótico, permite que podamos monitorizar la reacción a través del MALDI-TOF MS.

En este trabajo evaluamos si el MALDI-TOF MS es capaz de detectar directamente desde el hemocultivo positivo, aislados clínicos productores de BLEEs a través del seguimiento de la reacción de hidrólisis ejercida por la bacteria sobre el antibiótico. Para ello, el estudio se dividió en dos fases. Una fase inicial de optimización del método y una segunda fase de validación en muestras clínicas.

En la primera fase, con el propósito de optimizar el método, se utilizaron 10 cepas isogénicas de *E. coli*, expresando diferentes β -lactamasas, tanto penicilinasas, como tipo AmpC o BLEE. Los antibióticos marcadores para estudiar la resistencia fueron cefotaxima y ceftazidima y se utilizó el ácido clavulánico como inhibidor de la resistencia de tipo BLEE, para confirmar su presencia en los aislados. La reacción se incubó a distintos tiempos de reacción, 60, 90, 120 y 180 min.

Las enzimas más rápidas en hidrolizar los antibióticos fueron las CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-32, y FOX-4 que alcanzaron una hidrólisis completa de cefotaxima en 60 min. Las enzimas de tipo SHV-12 y DHA-7 alcanzaron una hidrólisis parcial. La incubación durante menos tiempo no fue capaz de proporcionar resultados positivos para ninguno de los aislados. La enzima CMY-2, que es la AmpC más prevalente en nuestra área, necesitó un tiempo de reacción de al menos 2 horas.

En cuanto a la ceftazidima, los primeros resultados positivos los encontramos a los 60 min para las enzimas SHV-12 y DHA-7, que muestran tan sólo una hidrólisis parcial del antibiótico. No es hasta los 120 min que comienzan a aparecer las primeras hidrólisis completas para las enzimas SHV-12 y CTX-M-15.

La ceftazidima es por tanto un antibiótico marcador con tiempos de detección más largos y con un mayor número de falsos negativos. Por eso, para la aplicación clínica del método, elegimos en primer lugar la cefotaxima como marcador de la resistencia. Además, las enzimas CTX-M son las enzimas más prevalentes en nuestra área y el tiempo de reacción es el más corto de los estudiados. En el caso de un resultado negativo, se testaría la ceftazidima utilizando un tiempo de incubación de 2 horas.

Una vez optimizado el método, se procedió a la validación clínica del ensayo sobre 128 hemocultivos positivos, previamente inoculados con aislados clínicos obtenidos en el Complejo Hospitalario Universitario A Coruña y sobre 13 muestras clínicas de hemocultivos positivos obtenidos de pacientes bacteriémicos. Los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF MS se correlacionaron con los obtenidos mediante métodos fenotípicos y caracterización genotípica.

El proceso de extracción bacteriana del aislado clínico desde el hemocultivo, se basó en el proceso de extracción utilizado para la identificación bacteriana usando el MALDI Sepsityper Kit (Bruker Daltonik, Germany), con ligeras modificaciones. El proceso de lavado se realizó por duplicado, para asegurarnos de que el pellet bacteriano estuviera completamente limpio y sin restos celulares. Una vez obtenido el pellet, se hizo una pre-incubación con lisozima, para facilitar la lisis bacteriana y que la enzima fuese liberada al medio más rápidamente. El siguiente paso fue ya la incubación con la solución antibiótica de cefotaxima y cefotaxima/clavulánico en paralelo durante 60 min y

posterior lectura en el equipo. En caso de un resultado negativo, se tesó la ceftazidima y ceftazidima/clavulánico, también en paralelo durante 120 min.

Los resultados obtenidos mediante el ensayo MALDI-TOF MS muestran una sensibilidad del 99% para aislados productores de BLEE y un 83% para productores de AmpC, con una especificidad del 100 % en ambos casos.

Rapid detection of enterobacteriaceae producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry

M. Oviño, B. Fernández, A. Fernández, M. J. Barba, C. Mourino and G. Bou

Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, A Coruña, Spain

Abstract

Bacteria that produce extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) are an increasing healthcare problem and their rapid detection is a challenge that must be overcome in order to optimize antimicrobial treatment and patient care. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) has been used to determine resistance to β -lactams, including carbapenems in *Enterobacteriaceae*, but the methodology has not been fully validated as it remains time-consuming. We aimed to assess whether MALDI-TOF can be used to detect ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from positive blood culture bottles in clinical practice. In the assay, 141 blood cultures were tested, 13 of them were real bacteraemias and 128 corresponded to blood culture bottles seeded with bacterial clinical isolates. Bacteraemias were analysed by MALDI-TOF after a positive growth result and the 128 remaining blood cultures 24 h after the bacterial seeding. β -lactamase activity was determined through the profile of peaks associated with the antibiotics cefotaxime and ceftazidime and its hydrolyzed forms. Clavulanic acid was added to rule out the presence of non-ESBL mechanisms. Overall data show a 99% (103 out of 104) sensitivity in detecting ESBL in positive blood cultures. Data were obtained in 90 min (maximum 150 min). The proposed methodology has a great impact on the early detection of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from positive blood cultures, being a rapid and efficient method and allowing early administration of an appropriate antibiotic therapy.

Keywords: Blood culture bottles, extended-spectrum β -lactamases, Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight

Original Submission: 18 February 2014; **Revised Submission:** 29 May 2014; **Accepted:** 15 June 2014

Editor: R. Cantón

Article published online: 19 June 2014

Clin Microbiol Infect

Corresponding author: G. Bou, Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Xubias de Arriba s/n, 3ª Planta Ed. Sur 15006 La Coruña, Spain
E-mails: german.bou.avevalo@sergas.es; german.bou@usc.es

Introduction

Antibiotic resistance, which is currently one of the most common healthcare problems worldwide [1,2], has increased in recent years. This has created the challenge of finding new methods to detect antibiotic-resistant bacteria as fast as possible to enable appropriate antibiotic therapy to be established.

In Gram-negative rods, especially *Enterobacteriaceae*, resistance conferred by extended spectrum β -lactamases (ESBLs) is the most prevalent type of β -lactam resistance and is increasing worldwide [3]. Since the appearance of penicillin, several forms of β -lactams have been described, including first, second, third, fourth and fifth-generation cephalosporines, β -lactam inhibitors, monobactams and carbapenemes [4,5]. Development of the therapeutic arsenal, coinciding with the appearance of β -lactamases, has led to the need to develop new susceptibility tests. More than 300 ESBLs have been identified since the first description of an ESBL, most of which belong to the TEM, SHV and CTX-M families [6]. The latter is the most prevalent worldwide, having replaced TEM and SHV [7,8]. Mass spectrometry methods, such as MALDI-TOF, detect mass shifts in the molecule we are following-up. To detect bacteria having β -lactam enzymes by MALDI-TOF, the

mass spectra of the antibiotic can be monitored, observing the disappearance of the original mass peaks and the appearance of new ones, corresponding to the hydrolyzed products as a new structure is originated [9–11]. If bacteria are sensitive, the antibiotic spectra will not change. Appearance of the mass peak corresponding to the β -lactamase enzyme can be monitored, but it has only been described for ampicillin-resistant *Escherichia coli* [12] and for the identification of CMY-2 β -lactamases [13]. Besides, these methods that focus on the enzyme identification are much slower and more tedious to carry out in a clinical laboratory.

MALDI-TOF MS is routinely and satisfactorily applied to identify bacteria in clinical microbiology laboratories. However, it has recently been used to detect microorganisms harbouring specific antimicrobial resistance mechanisms [14].

The aim of this study was to assess whether MALDI-TOF can be used in clinical practice to detect ESBL-producing microorganisms from positive blood cultures.

Material and Methods

Bacterial strains

As a preliminary step and to optimize the methodology, we built 10 isogenic *E. coli* strains expressing the following β -lactamase (cephalosporinase) genes in the same pBGS18-pCT vector (pB) (kanamycin resistance) and under the control of a *bla*_{CTX-M} promoter, being a multicopy plasmid: *bla*_{TEM-1} (non-ESBL β -lactamase) as negative control, *bla*_{SHV-12} (ESBL), *bla*_{TEM-29} (ESBL), *bla*_{CTX-M-32} (ESBL), *bla*_{CTX-M-14} (ESBL), *bla*_{CTX-M-15} (ESBL), *bla*_{FOX-4} (AmpC-type), *bla*_{CMY-2} (AmpC-type), *bla*_{DHA-1} (AmpC-type), *bla*_{DHA-6}

(AmpC-type) and *bla*_{DHA-7} (AmpC-type) [15], with MICs for both cefotaxime and ceftazidime antibiotics covering a wide range (Table I). Also, 128 bacterial clinical isolates collected during 2012–2013 (seven wounds, one bile secretion, one respiratory secretion and 119 ITU isolates) that were seeded in blood culture bottles for further MALDI-TOF analysis (only one strain by patient) were also included in this study. These isolates were identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), and antimicrobial susceptibility was determined by commercial microdilution broth (Panel 53, Microscan walkway plus40, Siemens Erlanger, Germany) and the disk diffusion test method. In several cases MICs were confirmed by using E-test strips (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). CLSI criteria and EUCAST recommendations were followed (www.eucast.org) for interpretation.

Among these 128 bacterial isolates, 22 were fully susceptible to either CTX and CAZ (no ESBL or AmpC-type), 12 out of 128 harboured AmpC-type enzymes and the remaining 94 isolates expressed ESBL β -lactamases, which were confirmed by phenotypic or molecular methods.

Thirteen positive blood cultures from patients with real bacteraemia (2012–2013) were also included in the study (10 *E. coli*, seven harbouring ESBL and three fully susceptible to third-generation cephalosporins, and three *Klebsiella pneumoniae* expressing an ESBL enzyme).

Preparation of fresh blood culture bottles and hydrolysis assay

Prior to inoculation in blood culture bottles, 128 bacterial clinical isolates were grown overnight on MacConkey-agar plates at 37°C. For the 10 *E. coli* isogenic controls, LB-agar

TABLE I. Cefotaxime and ceftazidime hydrolysis at the indicated time for the isogenic *Escherichia coli* control strains expressing different β -lactamases.

<i>Escherichia coli</i> expressing the indicated β -lactamases	MIC (mg/L)		Hydrolysis time							
			60 min		90 min		120 min		180 min	
	CTX	CAZ	CTX ^a	CAZ ^b	CTX	CAZ	CTX	CAZ	CTX	CAZ
TEM-1	<1	1	— ^c	—	—	—	—	—	—	—
SHV-12	24	>256	+/- ^d	+/-	+/-	+*	+/-	+	+/-	+
TEM-29	<1	4	—	—	—	—	—	+/-	—	+/-
CTX-M-14	64	2	+	—	+	—	+	+/-	+	+/-
CTX-M-15	128	64	+	—	+	—	+	+	+	+
CTX-M-32	>256	128	+	—	+	—	+	+/-	+	+
FOX-4	>256	128	+	—	+	—	+	+/-	+	+
CMY-2	4	48	—	—	—	—	+/-	+/-	+	+
DHA-1	8	32	—	—	—	—	+/-	+/-	+/-	+
DHA-6	1	4	—	—	—	—	+/-	+/-	+/-	+/-
DHA-7	32	128	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+

^aCefotaxime.

^bCeftazidime.

^cThere is no hydrolysis observed.

^dPartial antibiotic hydrolysis is detected. In the same spectrum both peaks from the non-hydrolyzed antibiotic and its hydrolyzed form are observed.

^eTotal antibiotic hydrolysis.

plates with kanamycin (50 mg/L) were added to maintain antimicrobial pressure.

After an overnight incubation, the above-cited bacterial isolates were seeded in blood culture bottles (BacT Alert, Biomerieux; Durham). We inoculated 1 mL of a 0.5 McFarland standard into blood culture bottles, which were incubated overnight at 37°C.

Positive blood cultures from bacteraemic patients were analyzed by MALDI-TOF after positivity was detected by the BacT/Alert 3D system (Biomerieux).

Then, 1 mL of the blood culture was removed with a syringe and proceeded to the protein extraction using the MALDI Sepsityper Kit (Bruker Daltonik GmbH), following the manufacturer's instructions, except that the washing solution was used twice instead of once in the last step [11]. The bacterial pellet was resuspended in 50 µL of lysozyme (Sigma Aldrich Munich, Germany, 40 mg/mL, in 50 mM tris-HCl buffer and 10 mM EDTA pH = 8.0; Roche, Basel, Switzerland, High Pure Plasmid Isolation Kit) and suspensions incubated at 37°C under agitation for 30 min [16]. Then, it was centrifuged for 5 min at 8500 g and the supernatant processed with 10 µL of cefotaxime (Sigma Aldrich; 500 mg/L) and/or ceftazidime (Sigma Aldrich; 25 mg/L) and 10 µL of cefotaxime/ceftazidime plus clavulanic acid (Sigma Aldrich; 50 mg/mL), for 60 and 120 min at 37°C, time that was optimized with control strains.

Cefotaxime was the first antibiotic to be tested as CTX-M enzymes are the most prevalent in our area and the expected time of hydrolysis is shorter. Afterwards, ceftazidime was tested. To confirm the presence of an ESBL, we performed MS peaks analysis in the presence or absence of clavulanic acid at the above-indicated concentration.

MALDI-TOF MS analysis and calibration

We spotted 1 µL of the solution onto the MALDI target plate. Once the spot dried (at room temperature), we placed 1 µL of MALDI matrix (10 mg/mL of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [α -HCCA] in 2.5% Trifluoroacetic-50% Acetonitrile, Bruker Daltonik) on top of the spot. Once the matrix had dried, we used flexControl 3.0 software (Bruker Daltonik GmbH) with a Microflex LT mass spectrometer to analyse the obtained measures. The spectrometer was equipped with a 60.0 Hz nitrogen laser, and the parameters were set as follows: Ion Source 1, 18.99 KV; Ion Source 2, 16.29 KV; lens, 6.00 KV; and low range mode. The mass range was between 100 and 1000 Da. Spectra were measured automatically. For calibration, we measured an external standard consisting of 573.31 Da bradykinin (1–5) (Sigma-Aldrich) and 757.40 Da bradykinin (1–7) (Sigma-Aldrich) in the same way as the samples. We also used peaks from the matrix, HCCA, for calibration: [M+H]⁺ at 190.05 Da and [2M+H]⁺ at 379.02 Da.

Spectrum analysis

Selected mass peaks are as follow: cefotaxime [456.5, 396.5 Da] and ceftazidime [547.5, 468.5 Da] and for their hydrolyzed products [414.5, 370.5 Da] and [486.5, 442.5 Da], respectively [11]. We used Flexanalysis 3.3 software (Bruker Daltonik GmbH) to analyse the spectra, which were smoothed and baseline subtracted. Peaks were selected using the Snap detection algorithm, a signal to noise threshold of 6, a relative intensity threshold of 0%, a minimum intensity threshold of 0%, a width peak of 0.75 m/z and Tophat baseline subtraction.

Characterization of β -lactamase genes

In some cases and to confirm the β -lactam resistance mechanism inferred by the phenotypic assay, some clinical bacterial isolates were further characterized to identify the β -lactamase gene involved in the antimicrobial resistance.

With this aim, PCR was used with β -lactamase's known oligonucleotides (Table 2) [17,18]. Clinical bacterial isolates were randomly selected for the molecular study as follow: (i) strains with cefotaxime MIC >32 mg/L ($n = 10$); (ii) strains with cefotaxime MIC between 1.5 and 12 mg/L ($n = 7$) and (iii) remaining strains with cefotaxime MIC <1 mg/L ($n = 13$). Also, those bacterial isolates directly obtained from positive cultures from bacteraemias were as well characterized: three sensitive *E. coli* showing no phenotypic resistance, seven *E. coli* and three *K. pneumoniae* with cefotaxime MIC >32 mg/L.

Results

Optimization of ESBL detection time

To optimize the detection time for the antibiotic hydrolysis, supernatants from the isogenic *E. coli* strains harbouring known β -lactamase genes were incubated with cefotaxime and ceftazidime for different times: 30 min, 60 min, 90 min, 120 min and 180 min. On analysing the spectra (Fig. 1) (Table 1), we found that CTX-M enzymes were capable of hydrolyzing cefotaxime in 60 min, and as they are the most prevalent ESBL in our area, this time was the chosen one for

TABLE 2. Primers used in this study

Target	Primers	Sequence (5' to 3')
CTX-M-group 1	CTXM1F	ATG GTG ACA AAG AGA ATG C
	CTXM1R	CAT CGC CGA AGG GTC GTA A
	CTXM9F	ATG GTT AAA AAA TCA CTG CGT CAG TT
CTX-M-group 9	CTXM9R	ATC GTC ACC AAC GGT TTG TAA
	TEM-type	TGCTGAAGATCAGTTGG
SHV-type	TEM1B	TAATTGTTGCCGGGAAG
	TEM2B	CCGGATCCATCGGTTATATTCGCCTGTG
CMY-2	SHV1A	CCGGATCCTTAGCGTTGCCAGTGCTCG
	SHV1B	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA
	CITMF	TTT CTC CTG AAC GTG GTC GGC
	CITMR	

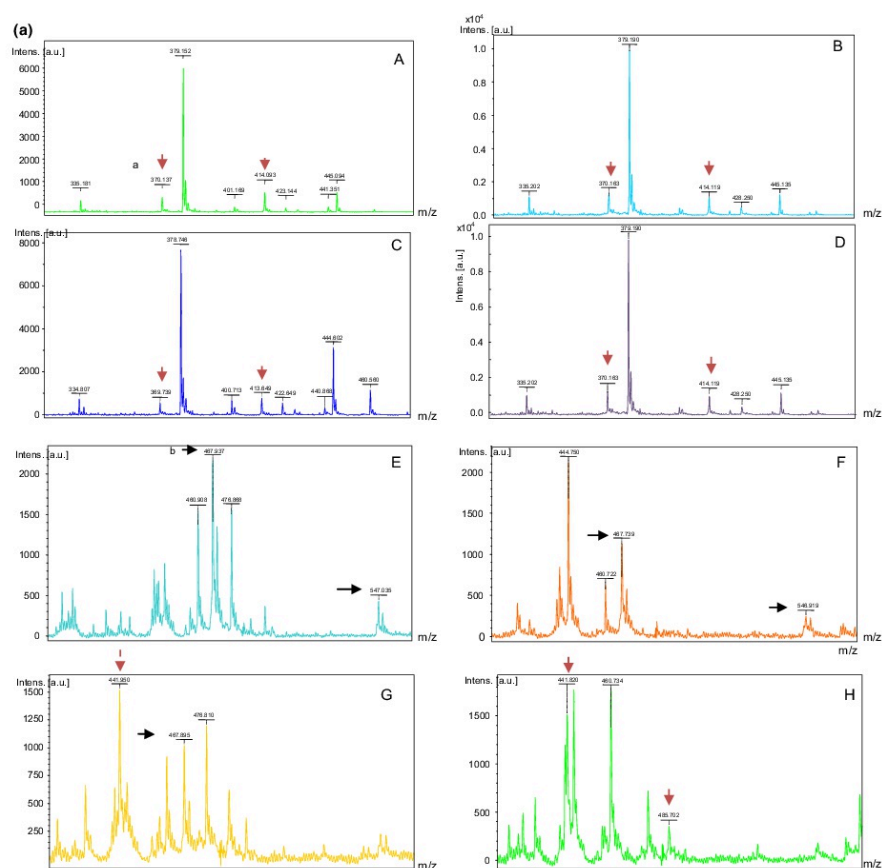


FIG. 1. (a) Mass spectra of cefotaxime at 60 min (A), 90 min (B), 120 min (C) and 180 min (D) and ceftazidime at 60 min (E), 90 min (F), 120 min (G) and 180 min (H) after exposure to the bacterial lysate of one isogenic *Escherichia coli* control strain expressing *bla*_{CTX-M-32}. (b) Mass spectra of cefotaxime at 60 min (A), 90 min (B), 120 min (C) and 180 min (D) and ceftazidime at 60 min (E), 90 min (F), 120 min (G) and 180 min (H) after exposure to the bacterial lysate of one isogenic *E. coli* control strain expressing *bla*_{CMY-2}. ^a ↓ Indicates the hydrolyzed peaks of the antibiotic. ^b → Indicates the antibiotic mass peaks (no hydrolyzed form).

further studies with clinical isolates. We cannot guarantee a sensitivity of 100% but shorten the response time of the technique. Also, ceftazidime was tested as a second marker for ESBL identification. Time of exposure chosen for ceftazidime hydrolysis detection by MALDI-TOF was 120 min, which matches CMY-2 enzyme hydrolysis, as it is the most prevalent AmpC-type enzyme in our area. At that time, despite full ceftazidime hydrolysis is not being detected, the

mass hydrolysis peaks appearance suggests the presence of β -lactamase activity and enables us to shorten the response time.

The rest of the isogenic *E. coli* control strains expressing different β -lactamases showed different hydrolysis times depending on their respective antibiotic MICs (Table 1) and they are shown as positive controls for exclusively comparative purposes (Fig. 2).

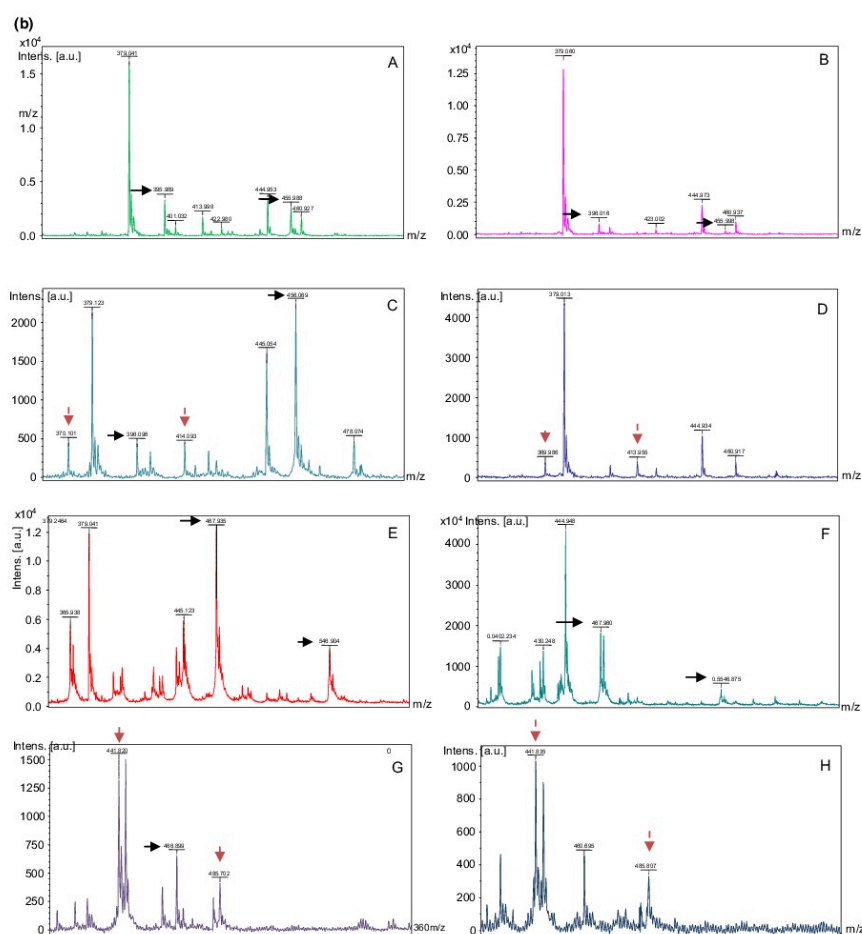


FIG. 1. (continued)

MALDI-TOF MS assays with bacterial isolates from positive blood culture bottles

The above-described conditions were used in the assay validation, both with positive blood cultures from real bacteraemias ($n = 13$) and with seeded blood culture bottles with clinical bacterial isolates ($n = 128$).

Real bacteraemias corresponded to 13 positive blood cultures: (i) three *E. coli* isolates fully susceptible to cefotaxime and ceftazidime without any antibiotic resistance mechanism; (ii) seven *E. coli* isolates showing high levels of

resistance (>32 mg/L) to cefotaxime and ceftazidime ($bla_{CTX-M-32}$) and (iii) three *K. pneumoniae* (>32 mg/L) also showing high levels of resistance to CTX and CAZ ($bla_{CTX-M-15}$). When they were analysed by MALDI-TOF all resistance bacterial isolates were correctly assigned as ESBL producers, whereas no hydrolysis peaks were detected in the susceptible isolates (Table 3). Overall data showed 100% sensitivity and specificity of MALDI-TOF to detect ESBL in positive blood cultures of bacteraemic patients.

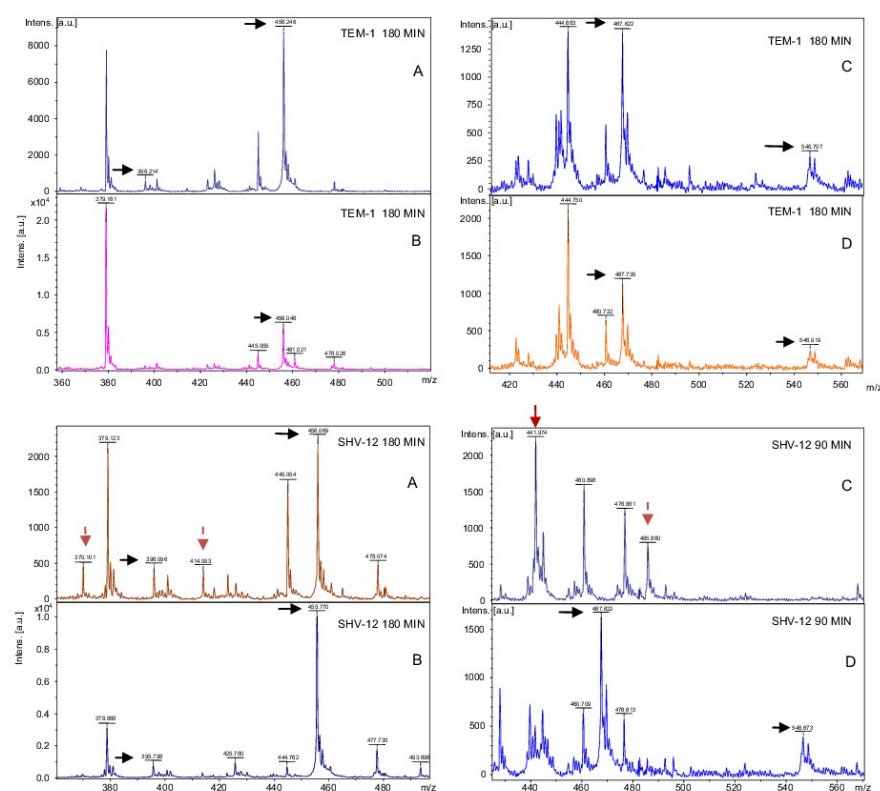


FIG. 2. (a) Mass spectra of cefotaxime (A), cefotaxime plus clavulanic acid (B), ceftazidime (C) and ceftazidime plus clavulanic acid (D) after exposure to the bacterial lysate at the time when the hydrolysis is higher. β -lactamase-type and time studied is indicated in the top right corner. β -lactamases belong to control strains are as follows: TEM-1 (non-ESBL), SHV-12 (ESBL), TEM-29 (ESBL with higher activity toward ceftazidime), CTX-M-14, -15, and -32 (ESBL), FOX-4, CMY-2, DHA-1, -6 and -7 (plasmidic AmpC-type enzymes). ^a↓ Indicates the hydrolyzed peaks of the antibiotic. ^b→ Indicates the antibiotic mass peaks (no hydrolyzed form).

In order to increase the statistical significance of our findings, 128 bacterial clinical strains showing different levels of resistance to CTX and CAZ were also used to blindly inoculate blood cultures as described above. Then MALDI-TOF analysis was performed and data analysed.

Among all bacterial isolates studied, MALDI-TOF identified all ESBL producers except one *E. coli* ($bla_{CTX-M-14}$, $MIC_{CTX} = 12$ mg/L, $MIC_{CAZ} \leq 1$ mg/L). Indeed, spectrophotometric analysis just detected very weak cefotaxime hydrolysis with this strain (data not shown). Among AmpC strains, six *E. coli* (bla_{CMY-2} , MIC_{CTX} from 1.5 to 8 mg/L) did not show

cefotaxime hydrolysis. However, we were able to detect CAZ hydrolysis in four of them ($MIC_{CAZ} > 8$ mg/L) (Table 4). The remaining two bla_{CMY-2} isolates were undetectable by MALDI-TOF ($MIC_{CAZ} = 4$ mg/L).

Results from MS hydrolysis in all bacterial isolates studied correlated well with the resistance levels to cefotaxime and ceftazidime. As MIC increased, the degree of antibiotic hydrolysis identified by MS analysis was higher. Data revealed that peaks resulting from cefotaxime or ceftazidime hydrolysis disappeared when clavulanic acid was added in the case of an ESBL mechanism, so the original mass peaks were restored. In

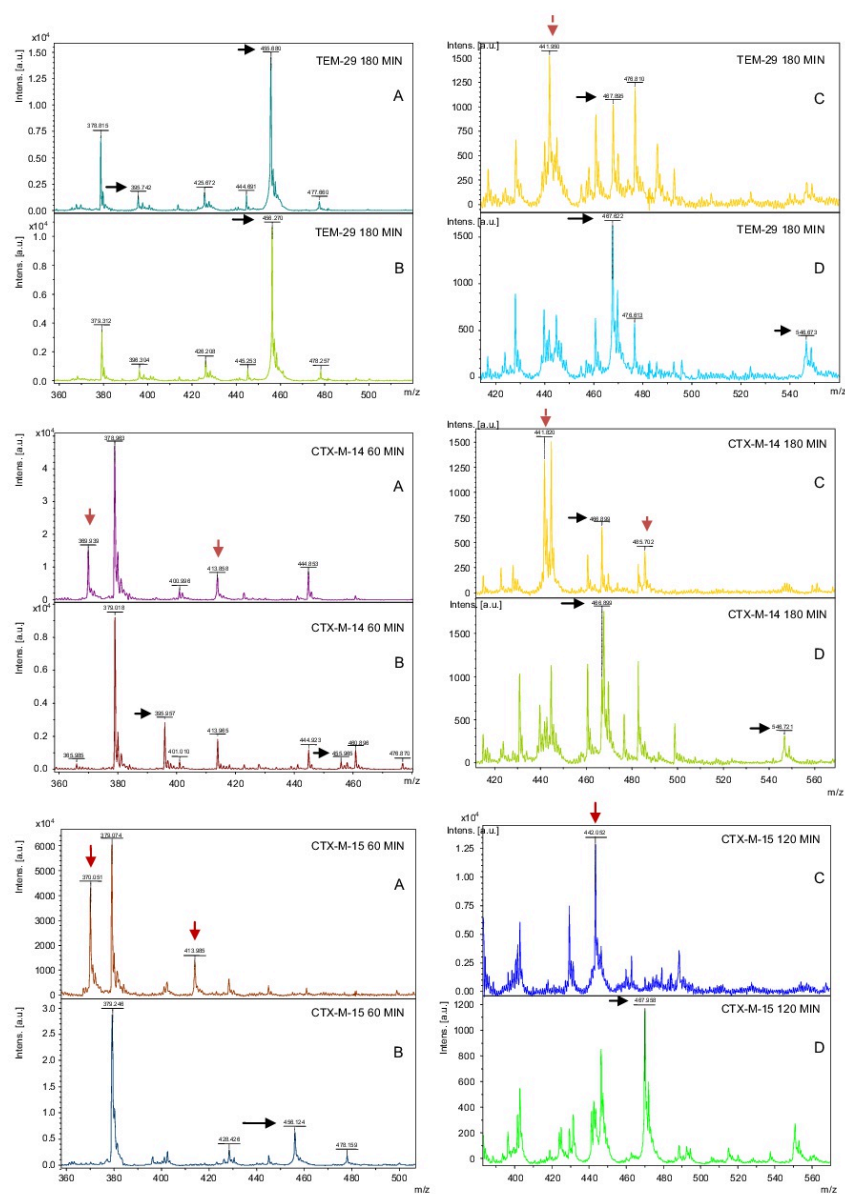


FIG. 2. (continued)

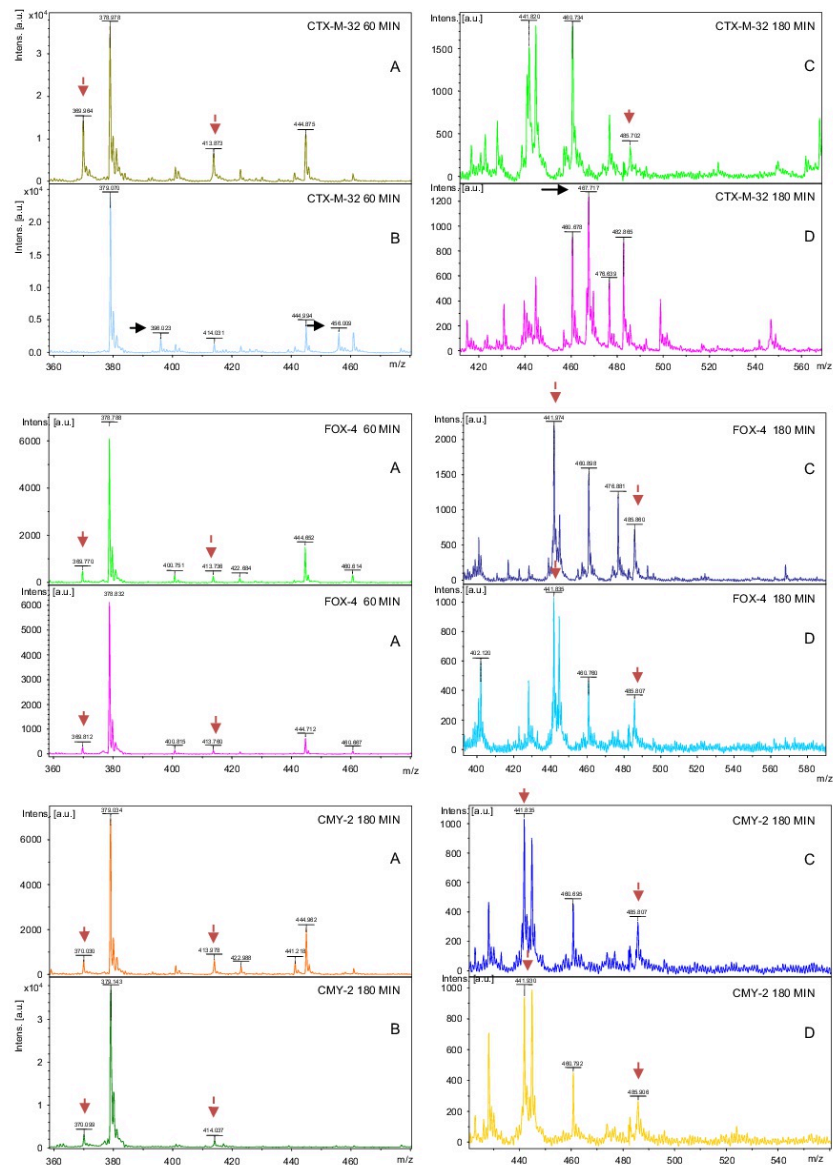


FIG. 2. (continued)

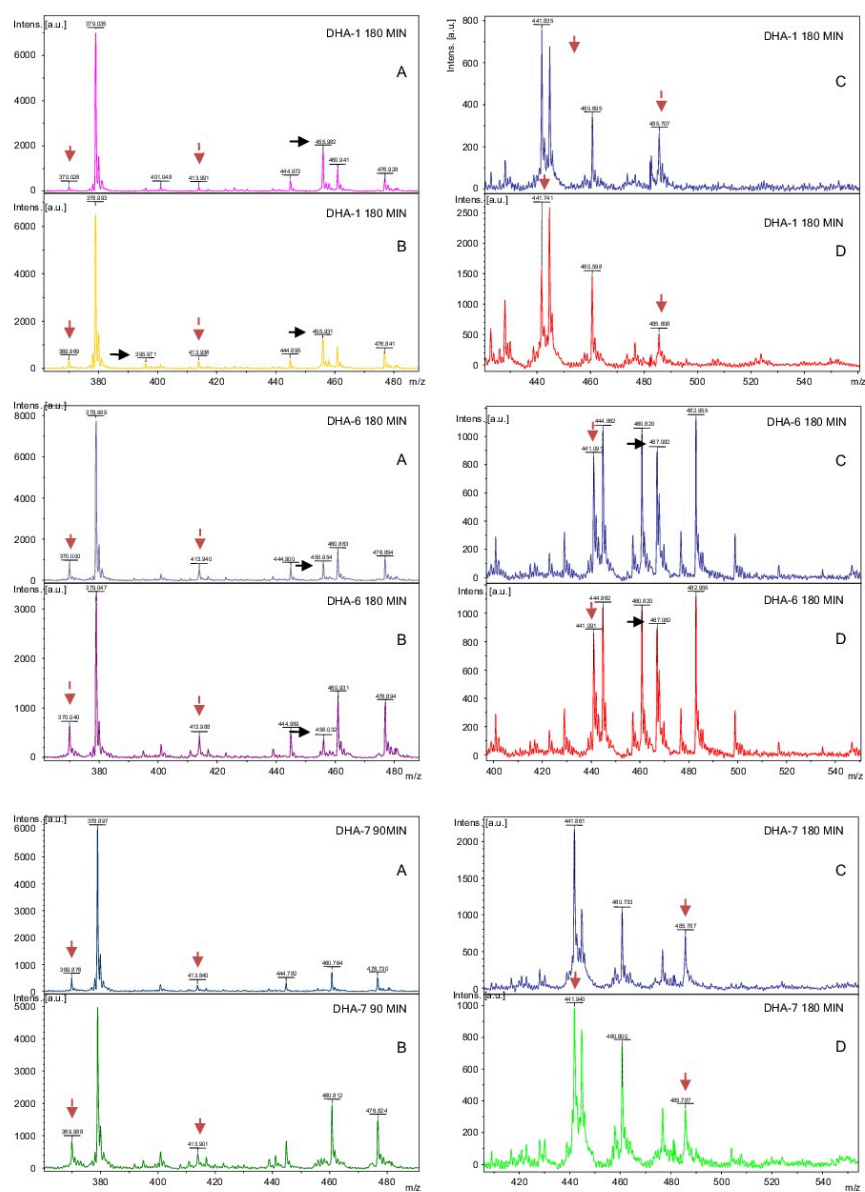


FIG. 2. (continued)

TABLE 3. Summary data of MALDI-TOF analysis of 13 positive blood culture bottles belonging to 13 different patients with bacteraemia

CTX MIC (mg/L) (n) ^a	CAZ MIC (mg/L) (n) ^a	Bacterial species	CTX MS positive result ^b	CAZ MS positive result ^b	Resistance mechanism
<=1 (n = 3)	<=1 (n = 3)	<i>Escherichia coli</i> (n = 3)	0% (0/3)	0% (0/3)	None
>32 (n = 10)	>32 (n = 10)	<i>E. coli</i> (n = 7)	100% (7/7)	100% (7/7)	<i>bla</i> _{CTX-M-32}
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n = 3)	100% (3/3)	100% (3/3)	<i>bla</i> _{CTX-M-15}

^aNumber of tested isolates at each MIC within parentheses.^bMS was considered positive when peaks of CTX and CAZ hydrolysis products were detected.**TABLE 4.** Summary data of MALDI-TOF analysis of 128 seeded blood culture bottles with corresponding bacterial isolates stratified by their MIC.

CTX MIC (mg/L) (n) ^a	CAZ MIC (mg/L) (n) ^a	Bacterial species (n) ^a	CTX MS positive result ^b	CAZ MS positive result ^b	Resistance result by MS (ESBL and/or AmpC) ^c	Resistance confirmed mechanism
<=1 (22)	<=1 (22)	<i>Escherichia coli</i> (1)	0%	0%	—	OXA-1
		<i>E. coli</i> (8)	0%	0%	—	TEM-1 ^d
		<i>Klebsiella pneumoniae</i> (1)	0%	0%	—	SHV-1 ^d
		<i>K. pneumoniae</i> (4)	0%	0%	—	TEM-1 + SHV-1 ^d
		<i>E. coli</i> (8)	0%	0%	—	None ^e
1.5 (1)	<1 (1)	<i>E. coli</i> (1)	100% (1/1)	0%	+	AmpC (CMY-2) ^e
1.5 (1)	≥16 (1)	<i>E. coli</i> (1)	0% (0/1)	100% (1/1)	+	AmpC (CMY-2) ^e
2 (1)	<1 (1)	<i>E. coli</i> (1)	100% (1/1)	0% (0/1)	+	ESBL
2 (1)	16 (1)	<i>E. coli</i> (1)	100% (1/1)	100% (1/1)	+	AmpC (CMY-2) ^e
2 (2)	4 (2)	<i>E. coli</i> (2)	0% (0/2)	0% (0/2)	—	AmpC (CMY-2) ^e
4 (1)	8 (1)	<i>E. coli</i> (1)	0% (0/1)	100% (1/1)	+	AmpC (CMY-2) ^e
4 (1)	16 (1)	<i>E. coli</i> (1)	0% (0/1)	100% (1/1)	+	AmpC (CMY-2) ^e
4 (2)	16 (2)	<i>K. pneumoniae</i> (2)	100% (2/2)	100% (2/2)	+	ESBL
6 (1)	2 (1)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	100% (1/1)	0% (0/1)	+	ESBL
8 (1)	16 (1)	<i>E. coli</i> (1)	100% (1/1)	100% (1/1)	+	ESBL
8 (1)	≥16 (1)	<i>E. coli</i> (1)	0% (0/1)	100% (1/1)	+	AmpC (CMY-2) ^e
8 (1)	≥16 (1)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	100% (1/1)	100%	+	ESBL
12 (1)	<=1 (1)	<i>E. coli</i> (1)	0% (0/1)	0%	—	ESBL (CTX-M-14) ^g
16 (1)	4 (1)	<i>E. coli</i> (1)	100% (1/1)	0% (0/1)	+	ESBL
16 (2)	16 (2)	<i>E. coli</i> (2)	100% (2/2)	100% (2/2)	+	ESBL
16 (1)	2 (1)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	100% (1/1)	0% (0/1)	+	ESBL
16 (1)	4 (1)	<i>K. pneumoniae</i> (1)	100% (1/1)	0% (0/1)	+	ESBL
16 (1)	≥16 (1)	<i>E. coli</i> (1)	100% (1/1)	100% (1/1)	+	AmpC
>=32 (85)	≥16 (85)	<i>E. coli</i> (3)	100% (85/85)	100% (85/85)	+	AmpC
		<i>E. coli</i> (73)				ESBL ^f
		<i>K. pneumoniae</i> (9)				ESBL

^aThe total number of strains studied was 128, distributed as shown in the column.^bNumber of strains that yielded either cefotaxime or ceftazidime hydrolysis peaks among total strains studied at the indicated cefotaxime/ceftazidime MIC. All extracts from bacterial isolates showed inhibition of cefotaxime/ceftazidime hydrolysis in the presence of clavulanic acid except those *E. coli* harbouring AmpC phenotypes.^cSuggested mechanism: ESBL and/or AmpC-type present (+), absent (—).^dClinical isolates characterized by PCR.^eThe *ampC*-type gene was characterized as *bla*_{CMY-2} in six clinical isolates with MIC between 1.5–8 mg/L. One strain with the ESBL phenotype and MIC = 12 mg/L for cefotaxime corresponded to a CTX-M-14 enzyme.^fESBL characterization of 10 randomly selected clinical isolates with cefotaxime MIC higher than 32 mg/L. Nine out of ten corresponded to a CTX-M-32 enzyme and the remaining one corresponded to a CTX-M-14 enzyme.^gNo resistance mechanism was found in these strains.

contrast, all strains expressing AmpC-type β -lactamases revealed unchanged peaks when the inhibitor was added. That confirmed the usefulness of adding clavulanic acid to detect an ESBL mechanism.

In conclusion, MS analysis was useful for detecting the presence of ESBL in clinical strains of *Enterobacteriaceae* obtained from blood cultures. Results obtained by MALDI-TOF match those obtained with control and clinical isolates with ESBL confirmed by either phenotypical or genotypical methods. Data revealed that the assay has an overall sensitivity of 99% (103/104) and specificity of 100% (104/104) in predicting ESBL resistance mechanisms in clinical strains of *Enterobacteriaceae* obtained from blood cultures. AmpC-producers have a sensitivity of 83% (10/12) and a specificity of

100% (12/12). Nonetheless, a higher number of isolates producing AmpC enzymes should be included in this study to reach better conclusions.

Discussion

MALDI-TOF mass spectrometry has been used satisfactorily in clinical microbiology laboratories for identification of bacteria [14]. However, MALDI-TOF analysis has recently been used to infer the presence of specific antimicrobial resistance mechanisms [9–11,16,19,20]. Here we report a novel approach that enables categorization of bacteria as ESBL producers according to MS cefotaxime/ceftazidime peaks identified directly from

positive blood cultures. The overall expected time is <2 h, taking into account protein extraction (5 min), hydrolysis assay (90 min, maximum 120) and spectrum acquisition and analysis (15 min). The assay is much faster than the methods used routinely in clinical practice, which require the growth of bacteria for at least 18–24 h.

The assay was validated with 141 bacterial isolates (13 real bacteraemias), obtained from different patients, with different types of β -lactamases and different levels of expression/resistance. A qualitative relationship between MIC and the degree of antibiotic hydrolysis obtained has been identified. Detection of the antibiotic hydrolysis became faster as the antibiotic MIC increased. Addition of clavulanic acid to the kinetic assays was also very important as it allowed us to associate antibiotic hydrolysis with a specific antimicrobial resistance mechanism, such as the presence or absence of ESBL. Recently, Sophia Jung et al. [20] obtained similar results in the detection of β -lactam resistance in blood culture bottles using ampicillin and cefotaxime; nevertheless, we have taken a step forward in trying to obtain the resistance mechanism implied and using a second cephalosporine because we were not able to detect all cases of ESBL (sensitivity was lower than 100%) when cefotaxime was used alone. The use of ceftazidime would undoubtedly enable detection of those strains carrying ESBL with a lower rate of cefotaxime hydrolysis but an increased effect of ceftazidime or those AmpC-type β -lactamases that have higher catalytic efficiency for ceftazidime than cefotaxime. The sensitivity of ESBL detection is not really improved by ceftazidime addition, as most of this phenotype is represented by CTX-M-type enzymes, but the overall sensitivity of the assay is increased and it is helpful for detecting AmpC strains, in our case *bla*_{CMY-2}. For the three strains (2 *bla*_{CMY-2} and 1 *bla*_{CTX-M-14}) in which the assay result was negative either for cefotaxime or ceftazidime hydrolysis, we confirmed it by spectrophotometry as the reference method. No hydrolysis at all was observed for both *bla*_{CMY-2} strains for both antibiotics (MIC_{CTX} = 2 mg/L, MIC_{CAZ} = 4 mg/L). The strain carrying *bla*_{CTX-M-14} (MIC_{CTX} = 12 mg/L, MIC_{CAZ} ≤ 1 mg/L) has a very weak hydrolysis for cefotaxime and no hydrolysis at all for ceftazidime.

This MALDI-TOF mass spectrometry assay for detecting ESBL in positive blood cultures is 99% sensitive and 100% specific. Hence, it is a very useful assay for clinicians searching for the most appropriate antibiotic therapy as it provides results rapidly without the need for expensive techniques, such as those based on PCR, that have a similar response time [21]. Besides the initial cost, if this methodology is appropriately transferred to a routine basis MALDI-TOF is a simple and low-demand method, which is an additional advantage. MALDI-TOF mass spectrometry could also be

used to detect other types of antibiotic resistance mechanisms in bacteria, which involve a change in the antibiotic used, not prescribed, as not always the antibiotic prescribed is a good marker for detecting an specific resistance mechanism, such as enzymatic modification of aminoglycosides or chloramphenicol [19].

Acknowledgements

We thank Álvaro Gomez from Francisco Soria Melguizo for technical support.

Funding

This study was funded by grants from the European Community, FP 7, ID: 278232 (MagicBullet), and by Plan Nacional de I+D+I 2008-2011 and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0014) co-financed by European Development Regional Fund 'A Way to achieve Europe' ERDF, and by the Fondo de Investigación Sanitaria (grant PI12/00552).

Transparency Declaration

Nothing to declare.

References

1. Gottlieb T, Nimmo GR. Antibiotic resistance is an emerging threat to public health: an urgent call to action at the Antimicrobial Resistance Summit. *Med J Aust* 2012; 194: 281–283.
2. French GL. The continuing crisis in antibiotic resistance. *Int Journal Antimicrob Agents* 2010; 36(Suppl 3): S3–S7.
3. Seiffert SN, Hilty M, Perreten V et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? *Drug Resist Updat* 2013; 16: 22–45.
4. Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microb Infect* 2008; 14(Suppl 1): 3–10.
5. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA et al. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 4943–4960.
6. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A Functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211.
7. Cantón R, González-Alba JM, Galán JC et al. CTX-M Enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012; 3: 110.
8. D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L et al. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 2013; 303: 305–317.

9. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Clin Microbiol* 2011; 49: 3321–3324.
10. Hrabák J, Walková R, Studentová V et al. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3222–3227.
11. Sparbier K, Schubert S, Weller U et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 927–937.
12. Camara J, Hays F. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389: 1633–1638.
13. Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Tuma M et al. Identification of CMY-2-type cephalosporinases in clinical isolates of Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 2952.
14. Kliem M, Sauer S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol* 2012; 15: 397–402.
15. Fernández A, Pérez A, Ayala JA et al. Expression of OXA-Type and SFO-1 β -lactamases induces changes in peptidoglycan composition and affects bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1877–1884.
16. Hooff GP, van Kampen JJ, Meesters RJ et al. Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res* 2012; 11: 79–84.
17. Cartelle M, Tomas M, Pertega S et al. Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4242–4249.
18. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2153–2162.
19. Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (maldi-tof) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 103–114.
20. Sophia Jung J, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrezewa M, Schubert S. Evaluation of MALDI-TOF MS for rapid detection of β -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 924–930.
21. Sullivan KV, Deburger B, Roundtree SS et al. Rapid detection of inpatient gram-negative bacteremia; extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemase resistance determinants with the Verigene BC-GN Test: a multi-center evaluation. *J Clin Microbiol* 2014 (ahead of print).

CAPÍTULO 3.2.

Artículo 2. Detección rápida de *Enterobacteriaceae* productoras de OXA-48 mediante Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Las enterobacterias productoras de carbapenemasas están sufriendo un alarmante aumento en los últimos años. Especialmente preocupante es el caso de los aislados productores de OXA-48. Estos aislados se caracterizan por poseer CMI bajas a los antibióticos carbapenémicos, por lo que son difícilmente detectables por la mayor parte de métodos fenotípicos. El MALDI-TOF MS ya ha sido aplicado con éxito para la detección de resistencias a antibióticos β -lactámicos, como los aislados productores de BLEE o carbapenemasas. Sin embargo aún no se ha desarrollado ningún método que detecte de forma rápida los aislados portadores de OXA-48.

El objetivo de este trabajo era evaluar si la tecnología MALDI-TOF MS puede ser válida para detectar y clasificar aislados productores de carbapenemasas de forma rápida y eficiente, con especial énfasis en los aislados productores de OXA-48.

Para ello nos propusimos utilizar el ertapenem como antibiótico marcador de la resistencia, ya que el meropenem presenta picos de masas muy próximos a los de la matriz, lo que dificultaría su lectura e interpretación y el imipenem no presenta picos de hidrólisis del antibiótico por lo que el seguimiento de la reacción y la evaluación de resultados es más compleja. Se utilizó también, el ácido fenilborónico y dipicolínico como inhibidores de los grupos A y B de carbapenemasas respectivamente. Por último, ya que no se dispone de un inhibidor específico de carbapenemasas de grupo D, se propuso el uso de la temocilina como un marcador de resistencia, ya que estos aislados muestran altos niveles de resistencia a este antibiótico.

Para ello se utilizaron un total de 161 aislados caracterizados genotípicamente, de los que 117 portaban una enzima carbapenemasa. Además de la caracterización genotípica, los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF MS, se compararon con los obtenidos mediante el método de disco difusión (Rosco Diagnostica, Dinamarca) con discos de meropenem combinados con inhibidores (ácido fenilborónico y dipicolínico) y temocilina.

El ensayo MALDI-TOF MS se realizó sobre aislados bacterianos tras el cultivo. Se estudió la hidrólisis del ertapenem en paralelo con el ertapenem más inhibidores, y también la temocilina. Para ello se empleó una solución antibiótica constituida por el antibiótico más un buffer de reacción, en el que se incluye el bicarbonato de amonio, el cuál facilita la reactividad de las enzimas OXA-48, sin afectar al resto de enzimas y el SDS que facilita la lisis bacteriana, con el fin de acelerar la reactividad enzimática. Se estudiaron tiempos de reacción de 15, 30, 60, 90 y 180 min.

La interpretación del espectro del ertapenem se realizó según *Sparbier et al* y la interpretación del espectro de temocilina se propone por primera vez. Para la clasificación como carbapenemasa de grupo A, se tiene que producir la hidrólisis de ertapenem y la recuperación inicial de los picos del antibiótico cuando se le añade ácido fenilborónico. Para la clasificación como carbapenemasas de grupo B, se tiene que producir la hidrólisis del ertapenem y la recuperación de los picos cuando se le añade ácido dipicolínico. Para la clasificación como carbapenemasa de grupo D, se tiene que producir la hidrólisis del ertapenem y además esta hidrólisis no se puede ver inhibida por ninguno de los inhibidores.

Ninguno de los aislados no productores de carbapenemasas resultaron positivos en el ensayo MALDI-TOF MS, ni siquiera aquellos con resistencia fenotípica a carbapenémicos. De entre los aislados productores de carbapenemasas la sensibilidad es de 98%, siendo únicamente los aislados no detectados, dos *Enterobacter cloacae* productores de IMP-22.

Los aislados productoras de enzimas de tipo VIM fueron los más rápidos hidrolizando el ertapenem, con un tiempo medio de 30 min. Los aislados más lentos fueron los portadores de enzimas de tipo IMP, con un tiempo medio de 80 min. El ácido fenilborónico y dipicolínico permitieron clasificar adecuadamente todos los aislados como pertenecientes al grupo A y B de carbapenemasas con un 100 % de especificidad.

El tiempo medio de hidrólisis del ertapenem para los aislados productores de OXA-48 fue de 60 min. Todos los aislados fueron además resistentes a la temocilina y el MALDI-TOF MS fue capaz de detectar esta resistencia en 15 min. La resistencia a temocilina fue también observada en 24 productores de metalo- β -lactamasas y en un aislado

productor de CTX-M. Sin embargo el tiempo requerido para hidrolizar la temocilina y posterior detección mediante el MALDI-TOF MS es más largo para estos aislados que para los productores de OXA-48, sirviendo este marcador como pronóstico. Debido a esto, podemos concluir que en áreas de alta prevalencia de enzimas de tipo OXA-48, la realización de un ensayo de hidrólisis de temocilina y detección mediante MALDI-TOF MS, tiene una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 93 % para un test con un tiempo de incubación de 15 min.

Comparando los resultados obtenidos mediante MALDI-TOF MS con el método de disco-difusión, la sensibilidad y especificidad para los grupos A y D de carbapenemasas, el 100% en ambos métodos. Sin embargo, para el grupo B la sensibilidad del disco-difusión es del 80% siendo para el MALDI-TOF MS del 96%.

Rapid Detection of OXA-48-Producing *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry

Marina Oviaño,^a Maria José Barba,^a Begoña Fernández,^a Adriana Ortega,^{b,c} Belén Aracil,^{b,c} Jesús Oteo,^{b,c} José Campos,^{b,c} Germán Bou^{a,c}

Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, La Coruña, Spain^a; Laboratorio de Antibióticos, Bacteriología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain^b; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Madrid, Spain^c

A rapid and sensitive (100%) matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) assay was developed to detect OXA-48-type producers, using 161 previously characterized clinical isolates. Ertapenem was monitored to detect carbapenem resistance, and temocillin was included in the assay as a marker for OXA-48-producers. Structural analysis of temocillin is described. Data are obtained within 60 min.

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) are increasingly being isolated worldwide. As these bacteria are difficult to detect and control, their spread is considered a public health concern (1, 2). Dissemination of the group D carbapenemases, particularly, *bla*_{OXA-48} isolates, is of major concern (3–5). These isolates are characterized by low carbapenem MICs and often go undetected by most phenotypic methods.

The development of mass spectrometry techniques, such as matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), has yielded sensitivity with faster turnaround times (6–10). The aim of this study was to determine whether a MALDI-TOF MS ertapenem assay can be used to identify and classify CPE producers, with particular emphasis on OXA-48-type isolates. We propose the use of temocillin as a resistance marker for OXA-48-type enzymes (11), as isolates harboring these types of carbapenemases show very high levels of resistance to temocillin (12, 13), and there is no specific inhibitor for group D carbapenemases. Phenylboronic acid (PBA) and dipicolinic acid (DPA) are used as inhibitors of, respectively, group A and B carbapenemases.

A total of 161 characterized nonrepeat *Enterobacteriaceae* isolates, 117 of which carried a carbapenemase enzyme, were tested (Table 1). Seventy-two of the 161 isolates were genotypically characterized by the Antibiotic Resistance Surveillance Program of the Spanish National Center of Microbiology (14), and the remaining 89 were characterized by the Microbiology Service of the A Coruña University Hospital Complex (15). The following isolates were identified: 79 *Klebsiella pneumoniae*, 16 *Klebsiella oxytoca*, 22 *Enterobacter cloacae*, 5 *Enterobacter aerogenes*, 35 *Escherichia coli*, 3 *Serratia marcescens*, and 1 *Citrobacter freundii*.

All isolates were analyzed by the disk diffusion method (KPC/MBL and OXA-48 confirm kit; Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark) with disks containing meropenem (10 µg), meropenem plus PBA, meropenem plus DPA, meropenem plus cloxacillin (CL), and temocillin (30 µg). A 0.5-McFarland suspension of the isolates on Mueller-Hinton II agar plates (Becton Dickinson, USA) was used, followed by an overnight incubation of the plates at 37°C. The susceptibility cutoff used for temocillin was <12 mm (12).

For the MALDI-TOF MS assay, isolates were previously grown overnight at 37°C in Trypticase soy agar with 5% sheep blood

(TSA II) (Becton Dickinson). The hydrolysis of ertapenem (0.5 mg/ml Invaz [Merck & Co., Inc.], 0.001% SDS, 50 mM NH₄HCO₃ [pH 7.0]) (6, 9) and temocillin (1.5 mg/ml Negaban [Eumedica], 0.001% SDS, 50 mM NH₄HCO₃ [pH 7.0]) (9) was evaluated after resuspension of the bacteria that filled a 1-µl inoculation loop in 10 µl of the antibiotic solution in an Eppendorf tube and incubation of the suspension at 37°C under agitation. When inhibitors were used, bacteria were resuspended in 5 µl of ertapenem (1 mg/ml Invaz, 0.001% SDS, 50 mM NH₄HCO₃ [pH 7.0]) and in 5 µl of the corresponding inhibitor solution: PBA (2 mg/ml; Sigma-Aldrich, Munich, Germany) for group A and DPA (3 mg/ml; Sigma-Aldrich) for group B carbapenemases.

Incubation times of 15, 30, 60, 90, and 180 min were tested for each isolate. The Eppendorf tubes were then centrifuged for 2 min at 13,000 × g at room temperature, and 1 µl of the supernatant was applied under 1 µl of α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), which is used as the matrix in the MALDI-TOF MS target. After drying of the matrix, measurements were performed (6).

MALDI-TOF MS analysis, calibration, and spectra processing (flexAnalysis software; Bruker Daltonics GmbH, Germany) were carried out as previously described by Oviaño et al. (10). The ertapenem spectrum was interpreted according to Sparbier et al. (6). For group A carbapenemase classification, mass peaks of ertapenem must reappear when PBA is added, and when DPA is added, mass peaks of the hydrolyzed form must remain, unlike for group B carbapenemases (Fig. 1a and b). For group D carbapenemase detection, ertapenem hydrolysis mass peaks must remain, regardless of the type of inhibitor added (Fig. 1c).

Received 14 September 2015 Returned for modification 3 October 2015
Accepted 6 December 2015

Accepted manuscript posted online 16 December 2015

Citation Oviaño M, Barba MJ, Fernández B, Ortega A, Aracil B, Oteo J, Campos J, Bou G. 2016. Rapid detection of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 54:754–759. doi:10.1128/JCM.02496-15.

Editor: C.-A. D. Burnham

Address correspondence to Germán Bou, german.bou@sergas.es.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

TABLE 1 Results of the comparison of the combined disk method and the MALDI-TOF MS method with specific A and B class inhibitors for detecting *Enterobacteriaceae* suspected of carbapenemase production

β-Lactamase class	No. of isolates per β-lactamase ^a	MALDI-TOF MS (% [no.]) assay ^b		MALDI-TOF MS avg time of ERT ^f hydrolysis detection (min)	TEM ^c analysis			Interpreted as class D carbapenemase positive by MALDI-TOF MS (no.)
		PBA ^d analysis: interpreted as class A carbapenemase positive	DPA ^e analysis: interpreted as class B carbapenemase positive		Resistance ^g (<12 mm)	TEM sensitivity by MALDI-TOF MS ^h	Average time of TEM hydrolysis detection (min)	
None	5							
SHV	5							
EBC	5							
K-1	5							
FOX	1							
CMY-2	4							
DHA	5							
TEM	1							
CTX-M	13				7 (1/13)	1/1	30	
KPC	20	100 (20/20)		50			50	
VIM	30		100 (30/30)	30	70 (19/30)	100 (19/19)	35	
NDM	7		100 (7/7)	55	14 (1/7)	1/1	60	
IMP	15		87 (13/15)	80	27 (4/15)	100 (4/4)	45	
OXA	45			60	100 (45/45)	100 (45/45)	15	100 (45/45)

^a A total of 161 isolates (44 noncarbapenemase producers and 117 carbapenemase isolates), distributed as indicated, were studied.^b Number of strains that yielded a positive result in the carbapenemase group classification by MALDI-TOF.^c TEM, temocillin.^d PBA, phenylboronic acid.^e DPA, dipicolinic acid.^f ERT, ertapenem.^g Temocillin resistance percentage calculated on the zone diameter around temocillin table (Rosco).^h Sensitivity of detection of temocillin resistance by MALDI-TOF MS. The resistance detected by temocillin disks (Rosco) was used as a reference.

None of the sensitive β-lactamase carrier isolates, AmpC-type isolates, or extended-spectrum β-lactamase [ESBL]-type isolates were classified as carbapenemase positive in the MALDI-TOF MS assay. Twenty-seven of the 44 isolates (61%) were found to be resistant to ertapenem by phenotypic methods (disk diffusion and Etest), but none of them hydrolyzed ertapenem (Table 1). These isolates were characterized as *bla*_{SHV-1} (*n* = 4), *bla*_{K-1} (*n* = 5), *bla*_{EBC} (*n* = 5), *bla*_{DHA} (*n* = 2), and *bla*_{CTX-M} (*n* = 11).

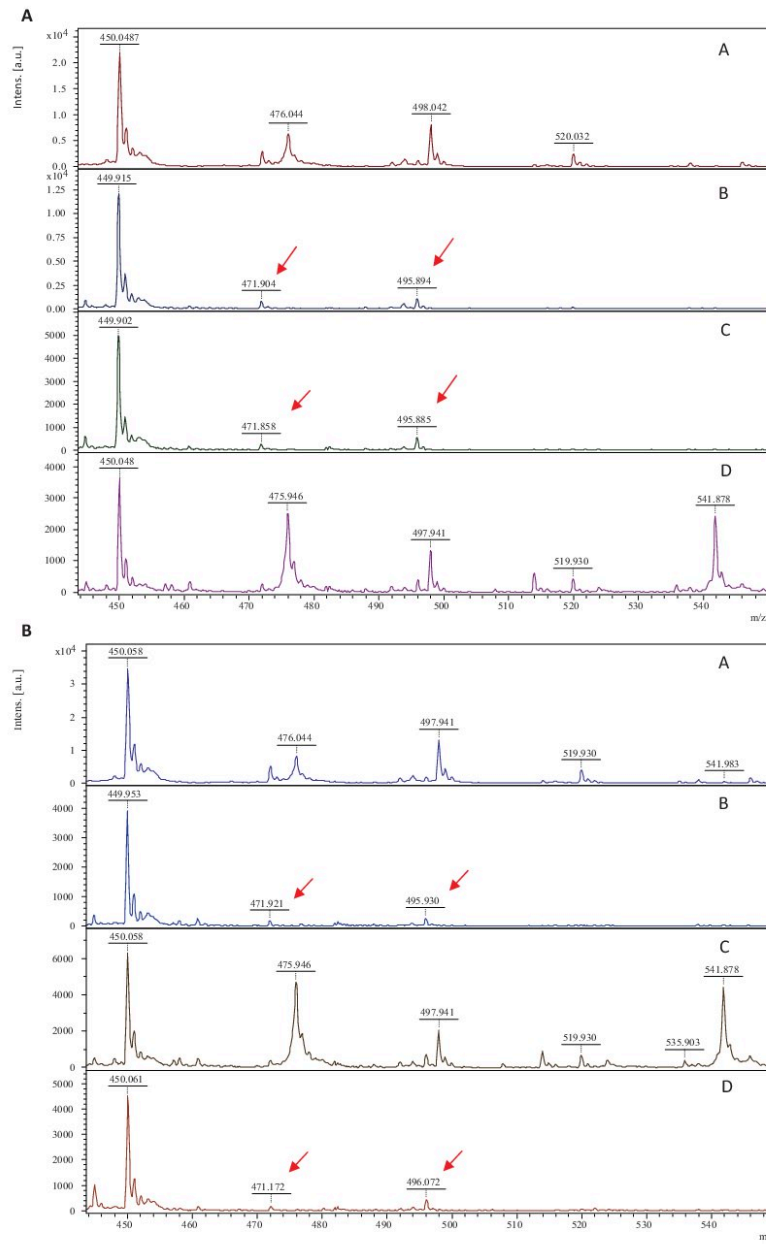
The average time for detection of ertapenem hydrolysis in class A carbapenemases by MALDI-TOF MS was 50 min, with 100% sensitivity. For detection of class B carbapenemases, the average time for ertapenem hydrolysis detection ranged from 30 to 80 min, and the sensitivity was 96% with a specificity of 100%. Within class B, VIM-type and NDM-type carbapenemases were accurately detected with 100% sensitivity and IMP-type producers with 87% sensitivity. The two undetected isolates were IMP-22-type *E. cloacae*. For identification of class D carbapenemases, MALDI-TOF MS exhibited 100% sensitivity for detecting ertapenem hydrolysis for all of the isolates tested, in an average time of 60 min, with no inhibition shown for any of the inhibitors (Table 1). To confirm the classification, temocillin hydrolysis was also evaluated.

Structural analysis and experimental data on the temocillin MS spectrum revealed the following: the molecular ion peak for temocillin [M + H]⁺ at 415 Da, the sodium adduct [M + Na]⁺ at 437 Da, and the metabolite corresponding to the elimination of the carboxyl group [Mdecarb + H]⁺ at 371 Da (Fig. 2). The main temocillin species detected correspond to the decarboxylated form, for which the mass peak tends to be more intense (around a

75% relative difference in the area under the peak) than for the sodium adduct and the molecular ion peak. The hydrolyzed form seems to be very unstable, as it was not detected in the spectrum: only a small peak for the hydrolyzed decarboxylated form [Mhydrolyzed/decarb + H]⁺ was sometimes detected at 389 Da. Temocillin resistance was determined either by the complete disappearance of temocillin peaks or by disappearance of the temocillin peaks plus the appearance of the hydrolyzed form. The relative intensity of the mass peaks within the same compound and spectrum is not relevant for interpretation of the resistance pattern.

All OXA-48-type enzymes (45/45, 100% sensitivity) were resistant to temocillin, and the MALDI-TOF MS assay was able to detect temocillin hydrolysis for all OXA-48 producers tested within 15 min. Temocillin resistance was also observed in 24 MBL producers and in a CTX-M producer (Table 1) (16). Thus, for accurate detection of the carbapenemase class, a carbapenem plus inhibitors must be included in the assay. However, the MALDI-TOF MS assay yields more accurate identification because the time required for temocillin hydrolysis can be used as a highly sensitive marker. The time required for detection of temocillin hydrolysis in OXA-48-type enzymes is 15 min, and the time needed for the other carbapenemases to reach a positive result is longer in all cases (more than 30 min), except for 3 VIM-1 *K. pneumoniae* isolates. In areas where OXA-48 producers are prevalent, the MALDI-TOF MS assay with inclusion of temocillin alone is highly sensitive, with a specificity of 93% (45/48) for a 15-min test. The method also helps to discount the possible presence of CPE, because of its high negative predictive value (100%).

The MALDI-TOF MS assay showed an overall sensitivity of



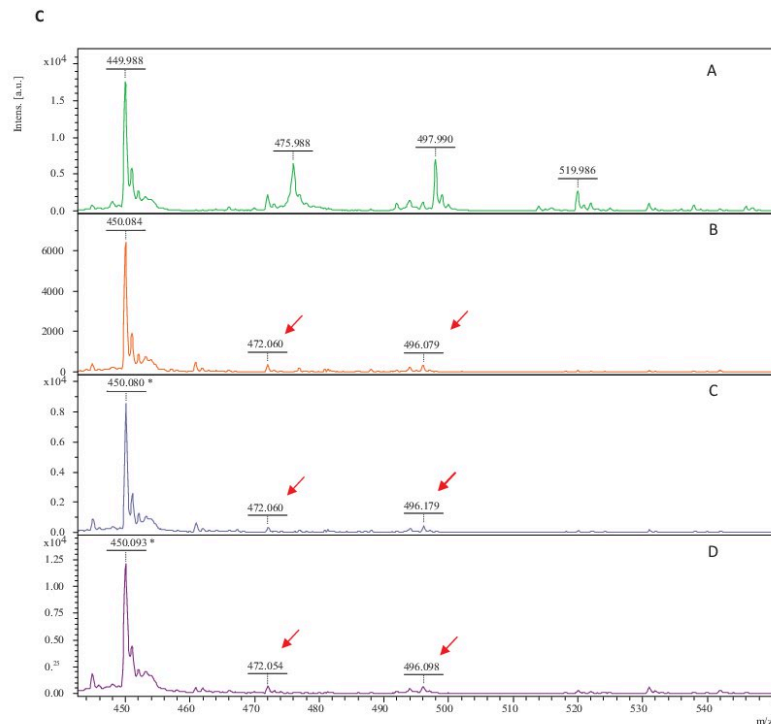


FIG 1 (a) Ertapenem mass spectra generated by group A carbapenemases: ertapenem mass spectra (negative control in the experiment) (spectrum A); mass spectra of ertapenem plus a *bla*_{KPC-2} *E. cloacae* strain after 60 min of exposure (spectrum B); ertapenem plus *bla*_{KPC-2} *E. cloacae* plus DPA (spectrum C); and ertapenem plus *bla*_{KPC-2} *E. cloacae* plus PBA (spectrum D). The peaks indicated (✓) are representative of ertapenem and its hydrolyzed forms. (b) Ertapenem mass spectra generated by group B carbapenemases: ertapenem mass spectra (negative control in the experiment) (spectrum A); mass spectra of ertapenem plus a *bla*_{VIM-1} *E. coli* strain after 15 min of exposure (spectrum B); ertapenem plus *bla*_{VIM-1} *E. coli* plus DPA (spectrum C); and ertapenem plus *bla*_{VIM-1} *E. coli* plus PBA (spectrum D). The peaks indicated (✓) are representative of ertapenem and its hydrolyzed forms. (c) Ertapenem mass spectra generated by group D carbapenemases: ertapenem mass spectra (negative control in the experiment) (spectrum A); mass spectra of ertapenem plus a *bla*_{OXA-48} *K. pneumoniae* strain after 90 min of exposure (spectrum B); ertapenem plus *bla*_{OXA-48} *K. pneumoniae* plus DPA (spectrum C); and ertapenem plus *bla*_{OXA-48} *K. pneumoniae* plus PBA (spectrum D). The peaks indicated (✓) are representative of ertapenem and its hydrolyzed forms. Intens., intensity; a.u., arbitrary units.

98% (115/117) and an overall specificity of 100% (117/117) for detecting carbapenemase producers. In comparison with the disk diffusion method, the MALDI-TOF MS assay shows the same sensitivity and specificity (100%) for detecting group A and D carbapenemases, but the results are produced faster (24 h earlier). For detection of group B carbapenemases, the disk diffusion assay exhibits a sensitivity of 80% (42/52) and the MALDI-TOF MS assay exhibits a sensitivity of 96%.

The assay was also performed on 8 blood cultures that were genotypically characterized as *bla*_{OXA-48} *K. pneumoniae*, obtained during an outbreak in August in the A Coruña University Hospital, giving an unequivocal pattern of an OXA-type isolate. The tests yielded promising results for future applications.

The biochemical Carba NP test yielded poor detection of OXA-48-type enzymes (sensitivity of around 80%), in contrast to the proposed method, which shows 100% sensitivity (9, 17, 18). The

vast majority of articles reporting other MALDI-TOF MS assays focus on detecting carbapenemases (6, 7, 9), and few focus on detecting metallo- β -lactamases (19) or oxacillinases (20). However, we report here for the first time a MALDI-TOF MS assay that enables detection and classification into Ambler classes A, B, and D simultaneously. Detection of OXA-48-type producers is particularly improved: other MALDI-TOF MS assays including ertapenem do not yield positive results within 2 h because they require an incubation time of 24 h (8). OXA-48-type producers have been detected within 90 min in imipenem-based assays (21) and within 120 min in meropenem-based assays (9); however, because inhibitors or any other resistance marker such as temocillin were not included, the isolates could only be classified as carbapenemase producers and could not be further identified as OXA-48-type producers without the support of genotypic methods. In the proposed new assay, ertapenem hydrolysis occurs in 60 min and te-

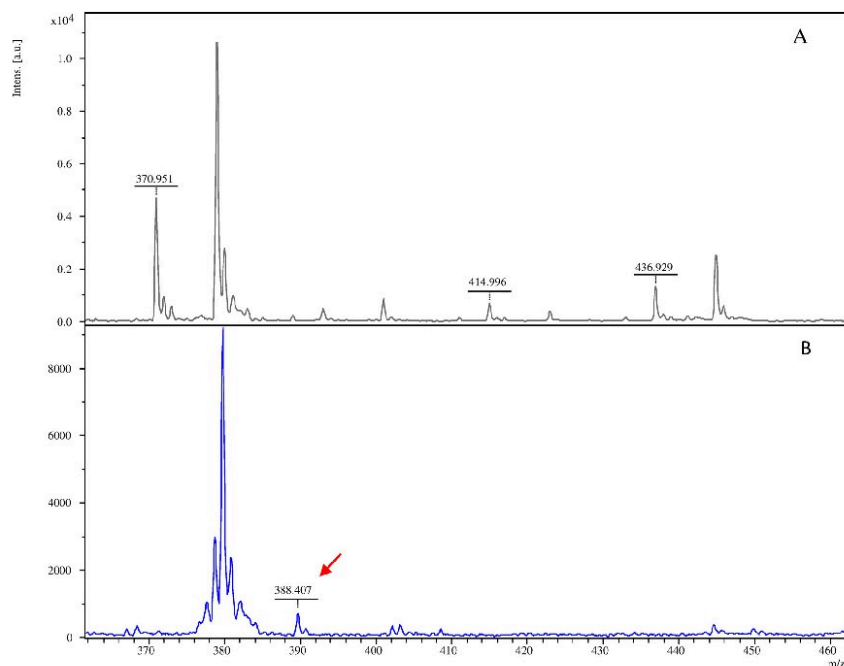


FIG 2 Temocillin mass spectra generated by OXA-48-type isolates (group D carbapenemases). Mass spectra of temocillin (A) and its hydrolyzed form (B) 15 min after exposure to a *bla*_{OXA-48} *K. pneumoniae* strain. The mass peaks indicated are representative of temocillin and its hydrolyzed form (✓).

mocillin hydrolysis in 15 min for OXA-48-type producers. This is due to the combined use in the reaction buffer of NH_4HCO_3 , which enhances ertapenem sensitivity (9), and SDS, which helps to lyse slime-producing isolates. In areas where OXA-48 producers are prevalent, inclusion of ertapenem and temocillin yields a reliable and ready to use assay for clinical practice. We suggest first testing the two antibiotics at 60 and 15 min, respectively. The assay shows 100% sensitivity and 93% specificity for detecting OXA-48 producers. If ertapenem plus inhibitors is tested at 60 min and temocillin at 15 min, the specificity reaches 100%. In areas where other resistance patterns are predominant, we suggest testing ertapenem plus inhibitors after 90 min. Informatics tools for automatic spectrum interpretation, such as STAR-BL prototype software (Bruker Daltonics GmbH), might be helpful for nonexperienced users to facilitate interpretation of the spectrum. Furthermore, they allow the calculation of the hydrolysis ratio of the antibiotics which might be a useful tool for future studies (22).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Sebastian van de Velde, Scientific Manager at Eumedica S.A., for providing us with temocillin (Negaban) and Soria-Melguizo S.A. for technical support.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by grants from the following organizations: Fondo de Investigación Sanitaria (grants PI12/01242 to J.O. and PI12/

00512 to G.B.); the Antibiotic Resistance Surveillance Programme of the Spanish Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Economía y Competitividad; the Plan Nacional de I+D+I 2008–2011; and the Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015), cofinanced by European Development Regional Fund “A Way to Achieve Europe” ERDF. The funders had no role in the study design, data collection, interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

1. Nordmann P, Poirel L. 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20:821–830. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12719>.
2. Cantón R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelson Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P, European Network on Carbapenemases. 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 18:413–431. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x>.
3. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, Hoffelder M, Witte W, Nordmann P, Poirel L. 2012. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 56:2125–2128. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.05315-11>.
4. Pitart C, Solé M, Roca I, Fabrega A, Vila J, Marco F. 2011. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48-lactamase in

- Klebsiella pneumoniae* in Spain. Antimicrob Agents Chemother 55:4398–4401. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00329-11>.
5. Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2014. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. Antimicrob Agents Chemother 58:467–471. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01344-13>.
 6. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. 2012. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. J Clin Microbiol 50:927–937. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.05737-11>.
 7. Burckhardt I, Zimmermann S. 2011. Using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. J Clin Microbiol 49:3321–3324. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00287-11>.
 8. Johansson A, Ekelöf J, Giske CG, Sundqvist M. 2014. The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and matrix-assisted laser desorption/ionization—time of flight. BMC Microbiol 14:89. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-14-89>.
 9. Papagiannitsis CC, Studentová V, Izdebski Oikonomou RO, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J. 2015. MALDI-TOF MS meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for the direct detection of carbapenemase activity. J Clin Microbiol 53:1731–1735. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03094-14>.
 10. Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mourino C, Bou G. 2014. Rapid detection of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum β -lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionization—time of flight mass spectrometry. Clin Microbiol Infect 20:1146–1157. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12729>.
 11. Livermore DM, Tulkens PM. 2009. Temocillin revived. J Antimicrob Chemother 63:243–245. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkn511>.
 12. Huang TD, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. 2014. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. J Antimicrob Chemother 69:445–450. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt367>.
 13. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. 2013. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect 19:E230–E232. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12146>.
 14. Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Campos J, Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Program. 2013. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. Antimicrob Agents Chemother 57:6344–6347. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01513-13>.
 15. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. 2002. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. J Clin Microbiol 40:2153–2162. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>.
 16. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, Leverstein-Van Hall MA, Cohen Stuart JW. 2014. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. Clin Microbiol Infect 20:345–349. <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12322>.
 17. Tijet N, Boyd D, Patel S, Mulvey M, Melano R. 2013. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 57:4578–4580. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00878-13>.
 18. Chong P, McCorister S, Unger M, Boyd D, Mulvey M, Westmacott G. 2015. MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. J Microbiol Methods 111:21–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2015.01.024>.
 19. Hoyos-Mallecot Y, Cabrera-Alvargonzalez JJ, Miranda-Casas C, Rojo-Martin MD, Liebana-Martos C, Navarro-Mari JM. 2014. MALDI-TOF MS, a useful instrument for differentiating metallo- β -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. Lett Appl Microbiol 58:325–329. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12203>.
 20. Álvarez-Buylla A, Picazo JJ, Culebras E. 2013. Optimized method for *Acinetobacter* species carbapenemase detection and identification by matrix-assisted laser desorption/ionization—time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 51:1589–1592. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00181-13>.
 21. Sauguet M, Cabroler N, Manzoni M, Bertrand X, Hocquet D. 2014. Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. J Microbiol Methods 105:88–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.004>.
 22. Jung J, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. 2014. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. J Clin Microbiol 52:924–930. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02691-13>.

CAPÍTULO 3.3.

Artículo 3. Protocolo universal para la detección rápida y automatizada de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas directamente de hemocultivos mediante Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

El reciente incremento en el número de aislados portadores de carbapenemasas tanto en *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* como *A. baumannii*, ha provocado una alarma sanitaria con el fin de intentar frenar su diseminación y detectar de forma temprana esta resistencia. Los carbapenémicos son los β -lactámicos con el espectro más amplio de actividad, incluyéndose habitualmente estos antibióticos, sólo o en combinación, para el tratamiento de los pacientes bacteriémicos y con sepsis acompañante. Es por esto, que el desarrollo de métodos de detección temprana de carbapenemasas es muy necesario.

El objetivo de este trabajo era presentar un nuevo método universal para detectar bacilos Gram negativos, ya sean fermentadores o no fermentadores, productores de carbapenemasas en hemocultivos. El estudio se dividió en dos partes, una primera parte de optimización de las condiciones de reacción y una segunda parte, en la que se desarrolló un protocolo para detectar la presencia de carbapenemasas directamente de los hemocultivos positivos con la metodología previamente optimizada. Como antibiótico marcador de la resistencia a carbapenémicos se utilizó el imipenem y para la interpretación de los espectros se utilizó un nuevo software automatizado el MALDI-TOF Biotyper (MBT) Compass Software en el Selective Testing of Antibiotic Resistance β -lactamase (STAR-BL).

La primera parte del estudio consistió en una optimización del método para conseguir una reactividad óptima. Para ello, se evaluaron diferentes buffers de reacción a diferentes pH, como el Tris-HCl pH=7, el citrato de amonio pH=6 y el bicarbonato de amonio pH=8, ya que la reactividad enzimática se ve muy afectada por el medio. También se evaluó la presencia de Zn^{2+} en el medio de reacción, ya que la reactividad de las metalo- β -lactamasas parece verse favorecida por la adición de pequeñas cantidades de este catión divalente. Por último, nos propusimos valorar la posibilidad de introducir

un paso de lisis bacteriana, comparando dos metodologías diferentes, el uso de SDS en el medio de reacción o la introducción de un paso de pre-lisis con el reactivo comercial B-PER II (Thermo-Fischer Scientific).

La evaluación de los diferentes buffers de reacción concluyó que el uso de Tris-HCl producía una mala cristalización de la matriz y por tanto unos espectros de mala calidad. La comparación entre el buffer de citrato de amonio y el de bicarbonato de amonio revelaba para ambos buffers una buena calidad en la adquisición de espectros, sin embargo en los ensayos desarrollados a pH= 8 con el buffer de bicarbonato, se veía facilitada la reactividad enzimática de las enzimas de tipo OXA-48, incrementándose la sensibilidad y reduciéndose el tiempo de reacción, sin verse afectada la reactividad para el resto de enzimas. La adición de Zn^{2+} resultó vital para las metalo- β -lactamasas de *P. aeruginosa*, ya que sin este compuesto varios de los aislados no consiguieron una reacción de hidrólisis positiva. La influencia de realizar lisis bacteriana sobre los aislados se investigó con un paso de pre-lisis con el reactivo B-PER II, el cuál se encontró que generaba una mala cristalización de la matriz, y también con la adición de SDS al buffer de reacción el cuál no influía negativamente en la cristalización de la matriz, además de facilitar la reactividad. Se encontró fundamentalmente, una mejora sustancial en la reactividad de los *A. baumannii*, ya que con la adición de este compuesto el ensayo de hidrólisis pasó de negativo a positivo para el 91% de los aislados testados a los 30 min de reacción y para el 100 % a los 60 min.

En este punto, se estableció el buffer final de reacción en 10mM NH_4CO_3 , $ZnCl_2$ 10 μ g/ml y 0.005% SDS pH=8.

Una vez establecidas las mejores condiciones de reacción, se procedió a evaluar el ensayo sobre los hemocultivos. Para ello se estudiaron 119 hemocultivos, con aislados previamente caracterizados genotípicamente e inoculados hasta la positividad. De estos 81 eran productores de carbapenemasas. También se estudiaron 20 hemocultivos positivos obtenidos de pacientes bacteriémicos en nuestro Hospital.

El primer paso para la realización del ensayo sobre los hemocultivos, fue optimizar el proceso de extracción bacteriana. Para ello, se partió del protocolo recomendado por Bruker Daltonik, para la extracción bacteriana desde hemocultivos en la identificación y

se evaluó el ensayo con el fin de reducir la cantidad de reactivo de lisis necesario para lisar la sangre y obtener el extracto bacteriano. Para la mayor parte de especies bacterianas, no observamos ninguna diferencia en la actividad hidrolítica en función de la cantidad de reactivo de lisis utilizado. Sin embargo, en *A. baumannii* cuando se utilizó 200 µl de reactivo de lisis (cantidad recomendada por el fabricante) ninguno de los aislados proporcionó un resultado positivo en el ensayo de hidrólisis. Cuando ésta cantidad se redujo a 100 µl el 93 % de los aislados fueron positivos. Para resolver el inconveniente de utilizar menos reactivo de lisis, con la consiguiente menor eliminación de los restos celulares de sangre, se propone el lavado del pellet una segunda vez con el buffer de reacción sin el antibiótico (10mM NH_4CO_3 , ZnCl_2 10µg/ml y 0.005% SDS pH=8).

Para el análisis de los resultados obtenidos, se introdujo el software automatizado MBT Compass Software en el módulo STAR-BL. Este software permite cuantificar el grado de hidrólisis del antibiótico, estableciendo un ratio o razón de hidrólisis, denominado logRQ. Debido a que el imipenem no tiene productos de hidrólisis detectables, la matriz lleva consigo incorporado un estándar interno, reserpina, cuya masa a 608 Da se encuentra en el rango de masas del ensayo y es además una molécula muy estable en EM. De forma que el logRQ, se calculará como el área debajo de la curva del pico de masas del estándar interno entre el pico de masas del imipenem. Los valores de logRQ se normalizarán con respecto a los controles positivo y negativo del ensayo y los valores se establecen en un diagrama de cajas. Los valores que estén por debajo de 0.2 implicarán una hidrólisis negativa y los que se encuentre por encima de 0.4 una hidrólisis positiva. Los valores intermedios implican una hidrólisis parcial, que requerirá de una segunda lectura o una incubación más prolongada.

Se observó una sensibilidad del 98% y una especificidad del 100% en la detección de bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas directamente de hemocultivos para un tiempo de reacción de 30 min. En los hemocultivos obtenidos de pacientes bacteriémicos, la sensibilidad fue del 100% (20/20) para un ensayo de 30 min.



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) [☆]

Marina Oviaño ^a, Katrin Sparbier ^b, Maria José Barba ^a, Markus Kostrzewa ^b, Germán Bou ^{a,*}^a Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Xubias de Arriba s/n, 3a Planta Ed. Sur, 15006 La Coruña, Spain^b Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 July 2016
Accepted 28 August 2016

Keywords:
MALDI-TOF
Antimicrobial resistance detection
Blood cultures
Imipenem

ABSTRACT

Detection of carbapenemase-producing bacteria directly from blood cultures is a major challenge, as patients with bacteraemia are critically ill. Early detection can be helpful for selection of the most appropriate antibiotic therapy as well as adequate control of outbreaks. In the current study, a novel matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF)-based method was developed for the rapid, automated detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* directly from blood cultures. Carbapenemase activity was determined in 30 min by measuring hydrolysis of imipenem (0.31 mg/mL) in blood cultures spiked with a series of 119 previously characterised isolates, 81 of which carried a carbapenemase enzyme (10 *bla*_{IMP}, 10 *bla*_{SHV}, 10 *bla*_{NDM}, 10 *bla*_{IMP}, 26 *bla*_{OXA-48-type}, 9 *bla*_{OXA-23}, 1 *bla*_{OXA-237}, 3 *bla*_{OXA-24} and 2 *bla*_{OXA-58}). Twenty blood cultures obtained from bacteraemic patients carrying *bla*_{OXA-48}-producing isolates were also analysed using the same protocol. Analysis was performed using MALDI-TOF Biotyper[®] Compass software, which automatically provides a result of sensitivity or resistance, calculated as the logRQ or ratio of hydrolysis of the antibiotic. This assay is simple to perform, inexpensive, time saving, universal for Gram-negative bacilli, and highly reliable (overall sensitivity and specificity of 98% and 100%, respectively). Moreover, the protocol could be established as a standardised method in clinical laboratories as it does not require specialised training in mass spectrometry.

© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* are resistant to most antibiotics [1–3]. Within this group, Enterobacteriaceae carrying class D carbapenemases (especially *bla*_{OXA-48} isolates) are an emerging healthcare concern [4–7]. In addition, mortality rates are high in patients with bacteraemia accompanied by severe sepsis [8,9], and initiation of adequate early therapy in such patients is therefore crucial for a positive outcome of treatment [10–12]. Carbapenems are the most powerful β -lactams, and most therapy regimens used for bacteraemia include these antibiotics, either alone or in different

combinations [13]. Methods allowing early detection of carbapenemases are therefore urgently needed.

Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) has become an established tool in microbiological laboratories for the rapid identification of microorganisms [14,15]. The method has also recently been used to detect β -lactamase activity by monitoring the mass peaks of the hydrolysed and non-hydrolysed forms of antibiotics [16–23]. Here we present a novel approach to the detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in blood cultures. The study was carried out in two parts. In the first part, the proposed method was evaluated to ensure optimal reaction conditions and correct MALDI-TOF acquisition. In the second part of the study, a protocol for detecting carbapenem resistance directly from blood cultures was developed using the previously optimised methodology. The technique was developed with imipenem diluted in an optimised reaction buffer, and the spectra obtained were interpreted using the novel automated MALDI-TOF Biotyper[®] (MBT) Compass software.

The aim of this study was to evaluate the potential of the assay, in terms of simplicity, practicality and reliability, as a routine clinical

[☆] Some of the results of this study were presented at the 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 9–12 April 2016, Amsterdam, The Netherlands.

* Corresponding author. Servicio de Microbiología, Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Xubias de Arriba s/n, 3a Planta Ed. Sur, 15006 La Coruña, Spain. Fax: +34 981 176 097.

E-mail addresses: german.bou.avevalo@sergas.es, german.bou@usc.es (G. Bou).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.024>

0924-6460/© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

diagnostic method for identifying sepsis-causing bacteria and for detecting carbapenem resistance.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial isolates

A total of 119 characterised non-replicate Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* and *A. baumannii* isolates from Spanish and German hospitals were tested (Supplementary Table S1), of which 81 carried a carbapenemase enzyme (10 *bla*_{KPC}, 10 *bla*_{NDM}, 10 *bla*_{IMP}, 26 *bla*_{OXA-48}-type, 9 *bla*_{OXA-23}, 1 *bla*_{OXA-237}, 3 *bla*_{OXA-24} and 2 *bla*_{OXA-58}). Bacteria expressing resistance mechanisms other than carbapenemases were used as negative controls, including 9 expressing narrow-spectrum β -lactamases (4 *bla*_{SHV-1} and 5 *bla*_{K1}), 12 AmpC-type (3 *bla*_{EBG}, 7 *bla*_{FOX-4}, 3 *bla*_{CMY-2} and 5 *bla*_{DHA}), 14 extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-type (14 *bla*_{CTX-M-type}) isolates and 3 isolates that remained fully susceptible to cephalosporins and did not express either AmpC-type, ESBL-type or any other β -lactamase or carbapenemase enzymes. The isolates comprised 54 *Klebsiella pneumoniae*, 7 *Klebsiella oxytoca*, 20 *Escherichia coli*, 12 *Enterobacter cloacae*, 1 *Enterobacter aerogenes*, 1 *Citrobacter freundii*, 7 *P. aeruginosa* and 17 *A. baumannii* strains. Twenty *bla*_{OXA-48}-producing *K. pneumoniae* isolates were used as positive controls for optimising the reaction buffer in the imipenem hydrolysis assay. All isolates were characterised regarding carbapenemases, ESBLs and AmpC-type enzymes by PCR and sequencing [24,25]. Furthermore, minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem for all of the isolates used in the study were determined using imipenem Etest strips (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

The approach was also applied to 20 positive blood cultures obtained from bacteraemic patients during an outbreak at the A Coruña University Hospital Complex (La Coruña, Spain). Characterisation of these isolates revealed *K. pneumoniae* strains all with *bla*_{OXA-48} genes, two of which were identified as mixed cultures containing *bla*_{OXA-48}-producing *K. pneumoniae* and an *E. coli* isolate sensitive to all β -lactams.

All tests were performed in the presence of a positive and negative control, i.e. isolates 1 and 98, respectively (Supplementary Table S1), which were treated in the same way as the samples.

2.2. Optimisation of the imipenem hydrolysis assay for detecting carbapenem resistance in plate-derived isolates

The first part of the study consisted of optimising the method to ensure optimal reaction conditions in the imipenem hydrolysis assay for Gram-negative bacilli and correct MALDI-TOF acquisition. First, reaction media of different pH in three reaction buffers were evaluated, as enzyme activity is strongly influenced by pH. These buffers were 50 mM Tris-HCl (pH 7), 10 mM ammonium hydrogen citrate (NH₄ citrate) (pH 6) and 10 mM NH₄HCO₃ (pH 8) (Fig. 1). The presence and absence of 10 μ g/mL Zn²⁺ in the previously chosen reaction buffer was then evaluated, as the reactivity of metallo- β -lactamases (MBLs) may be improved by addition of this compound. Two different procedures of (pre)-lysis in the medium were then evaluated, so that the cell wall could be broken and the enzyme easily released. The first step was accomplished by measuring the activity of different concentrations of sodium dodecyl sulphate (SDS) (0.003%, 0.005% and 0.001%) (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) against different isolates (Fig. 2; Supplementary Table S1) in the previously chosen reaction buffer. The second step was accomplished by measuring the effect of pre-lysis of the bacteria by using B-PER II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) according to the manufacturer's instructions. Finally, the time required for complete hydrolysis was evaluated.

Briefly, the assay was performed with a 1 μ L loop of plate bacteria re-suspended in 50 μ L of reaction buffer containing 0.25 mg/mL imipenem (Sigma-Aldrich) with a series of modifications described above. The hydrolysis set-ups were incubated at 37 °C for 30 min and 60 min under agitation.

2.3. Blood cultures

Blood cultures were spiked by inoculating blood culture flasks (Bactec™ Aerobic/F Culture Vials; Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) containing 10 mL of human blood and 200 μ L of a 0.5 McFarland suspension of the respective isolate derived from a fresh overnight culture. Cultures were incubated in an automated system (Bactec™ FX; Becton Dickinson) until the flask was flagged as positive.

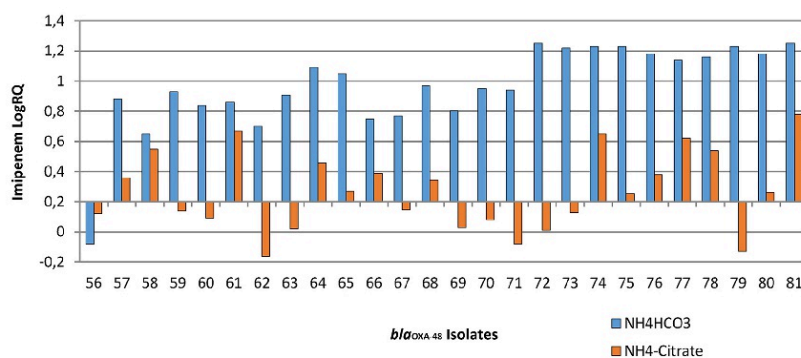


Fig. 1. Influence of incubation buffer on hydrolysis of imipenem by *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48-type carbapenemase. Normalised logRQ (ratio of hydrolysis) values for 26 different OXA-48-type-producing *K. pneumoniae* positive controls (Supplementary Table S1) following incubation in 10 mM NH₄HCO₃ (pH 8) or 10 mM ammonium hydrogen citrate (NH₄-citrate) (pH 6) for 30 min.

Please cite this article in press as: Marina Oviaño, Katrin Sparber, María José Barba, Markus Kozłowska, Germán Bou, Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/MS), International Journal of Antimicrobial Agents (2016), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.08.024

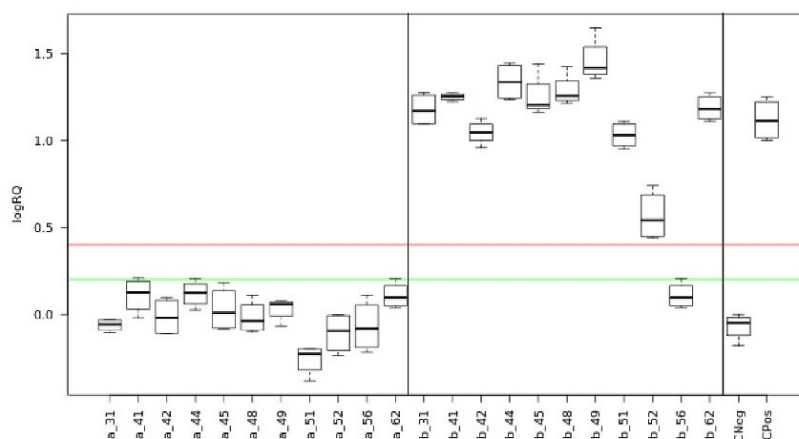


Fig. 2. Influence on imipenem hydrolysis of inclusion of sodium dodecyl sulphate (SDS) in the reaction buffer. Normalised logRQ (ratio of hydrolysis) values of the imipenem hydrolysis of different isolates (Supplementary Table S1). Plate-derived isolates were incubated either with 0.25 mg/mL imipenem in 10 mM NH_4CO_3 , ZnCl_2 10 $\mu\text{g/mL}$ ('a' isolates) or with 0.25 mg/mL imipenem in 10 mM NH_4CO_3 , ZnCl_2 10 $\mu\text{g/mL}$, 0.005% SDS ('b' isolates). CNeg and CPos represent negative and positive controls, respectively. Results are displayed in a boxplot, describing the median, first and third quartiles, and the maximum and minimum values for imipenem hydrolysis. Normalised logRQ values below the green line (logRQ = 0.2) indicate negative hydrolysis, whereas values above the red line (logRQ = 0.4) indicate β -lactamase activity; normalised logRQ values between 0.2 and 0.4 indicate an ambiguous or intermediate hydrolysis. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Once the blood cultures obtained directly from patients had been flagged as positive, carbapenem-resistant bacteria were detected by MALDI-TOF, in parallel with the procedure used in our laboratory to confirm the presence of carbapenemase in blood cultures (Xpert® Carba-R; Cepheid, Sunnyvale, CA).

2.4. Direct β -lactam susceptibility testing in blood cultures by MALDI-TOF Biotyper Compass software

The second part of the study consisted of testing blood cultures with the previously optimised method. As an initial step involving extraction of bacteria from blood cultures is required, this step was also evaluated.

The Sepsityper® Kit (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) was used to extract bacteria from positive blood cultures according to the manufacturer's recommendations and with slight modifications. Briefly, 200, 125 or 100 μL of the lysis buffer supplied was added to 1 mL of the blood culture. Following lysis of red blood cells, the effect of washing the bacterial pellet, either with the washing buffer (Sepsityper Kit) or with the incubation buffer (10 mM NH_4CO_3 , ZnCl_2 10 $\mu\text{g/mL}$ and 0.005% SDS) previously optimised, was investigated by analysing the quality of the spectra derived from the imipenem hydrolysis assay.

For analysis of blood cultures by MALDI-TOF, the bacterial pellet (extracted using the Sepsityper Kit) was re-suspended in 40 μL of a solution containing 0.31 mg/mL imipenem (Sigma-Aldrich) in the previously optimised reaction buffer. The hydrolysis set-ups were incubated at 37 °C for 30 min and 60 min under agitation.

2.5. MALDI-TOF/MS analysis

For MALDI-TOF/MS measurements, 1 μL of supernatant was spotted in duplicate directly onto a polished steel MALDI target plate. Dried spots were overlaid with 1 μL of the STAR-BL matrix containing a modified reserpine (Bruker Daltonik GmbH), represented

by the mass of 607.26 Da as an internal standard [10 mg/mL of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (α -HCCA) in 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid; Bruker Daltonik GmbH]. Use of reserpine as an internal standard enables determination of the logRQ values for imipenem hydrolysis as it is a highly stable molecule in the mass range of the method used in the analysis. After the matrix was dried, mass spectra were acquired on a microflex LT/SH bench-top mass spectrometer (Bruker Daltonik GmbH) equipped with a 60 Hz nitrogen laser. Measurements were performed in the mass range between 300 Da and 600 Da, with a peak resolution >300 Da. Measurements were made using the MBT Compass software with the STAR-BL module (Bruker Daltonik GmbH).

2.6. Data evaluation

The MBT Compass STAR-BL module (MBT Compass 4.1.23; Bruker Daltonik GmbH) software automatically provides the logRQ values for imipenem hydrolysis by calculating the logarithmic ratio of the intensity of the internal standard peak and the intensities of the non-hydrolysed imipenem. LogRQ values were normalised according to defined negative and positive control strains. Normalised logRQ values similar to or below 0.2 indicate negative strains.

Normalised logRQ values close to or above 0.4 indicate β -lactamase activity. Normalised logRQ values between 0.2 and 0.4 indicate an ambiguous hydrolysis measurement that requires further testing (re-testing or prolonging the incubation time).

3. Results

3.1. Optimisation of the imipenem hydrolysis assay for detection of carbapenem resistance in plate-derived isolates

Regarding the different buffers employed, use of Tris-HCl as an incubation buffer yielded poor crystallisation of the MALDI-TOF matrix and therefore poor quality spectra. Comparison between NH_4 -

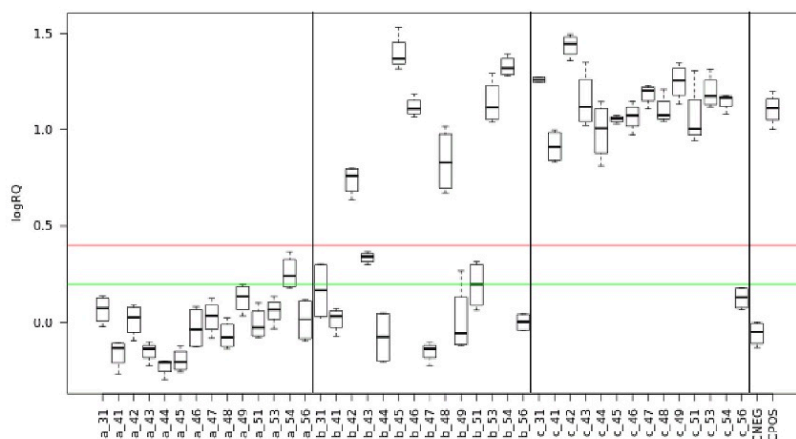


Fig. 3. Influence on imipenem hydrolysis of the amount of lysis buffer used during extraction of bacteria from blood cultures. Normalised logRQ (ratio of hydrolysis) values of imipenem hydrolysis by micro-organisms isolated from blood cultures (Supplementary Table S1) after blood cell lysis with different amounts of lysis buffer: 200 µL ('a' isolates); 125 µL ('b' isolates); and 100 µL ('c' isolates). CNEG and CPOS represent negative and positive controls, respectively. Results are displayed in a boxplot, describing the median, first and third quartiles, and the maximum and minimum values for imipenem hydrolysis. Normalised logRQ values below the green line (logRQ = 0.2) indicate negative hydrolysis, whereas values above the red line (logRQ = 0.4) indicate β -lactamase activity; normalised logRQ values between 0.2 and 0.4 indicate an ambiguous or intermediate hydrolysis. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

citrate and NH_4HCO_3 revealed that both buffers yielded good quality spectra, although the activity of the OXA-type enzymes was different in each buffer (Fig. 1). Performance of the assay at pH 8 yielded measurement of higher activity of the OXA-type carbapenemases. Following incubation at pH 8 for 30 min, all strains except one showed measurable activity. In contrast, when incubated at pH 6, only 7 of 26 isolates had hydrolysed imipenem after 30 min. Isolates harbouring *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}* or *bla_{VIM}* did not display any detectable differences in activity when incubated in different incubation buffers of varying pH (data not shown).

Addition of Zn^{2+} to the reaction buffer is crucial for optimal activity of MBL enzymes in *P. aeruginosa* isolates. These isolates were not able to hydrolyse imipenem without inclusion of Zn^{2+} in the incubation buffer (data not shown). We have not observed the need for Zn^{2+} addition to the reaction buffer in the case of *Acinetobacter* spp. or Enterobacteriaceae isolates, but as reactivity is not decreased either, inclusion of Zn^{2+} is required for improving global reactivity.

The influence of cell lysis on the hydrolysis of imipenem was investigated next. Use of B-PER II resulted in poor MALDI-TOF preparations, which hampered spectral acquisition. However, addition of small amounts of SDS did not negatively influence MALDI-TOF spectral acquisition. For *A. baumannii* and mucoid Enterobacteriaceae, addition of SDS had a positive effect on hydrolysis. Without addition of SDS to the bicarbonate incubation buffer, 11 of 11 isolates were negative after 30 min of incubation. On supplementation of the incubation buffer with 0.005% SDS, all isolates except one were positive (isolate b_56, Fig. 2). When the reaction time was increased to 60 min, 7 of 11 isolates were capable of hydrolysing imipenem without SDS, and in the presence of 0.005% SDS 11 of 11 were able to hydrolyse imipenem.

The solution finally used to detect carbapenemase activity in Gram-negative bacilli was imipenem in a reaction buffer containing 10 mM NH_4CO_3 , ZnCl_2 10 µg/mL and 0.005% SDS (pH 8) according to the results obtained for optimisation of the reactions conditions for the different bacterial species. The solution must be

prepared daily if stored at room temperature, although the buffer remains stable for 15 days at room temperature and therefore the final imipenem solution only needs to be added daily. The solution can also be frozen at -20°C for 15 days.

3.2. Direct β -lactam susceptibility testing from blood cultures using MALDI-TOF Biotyper Compass software

The amount of lysis buffer from the Sepsityper Kit needed to lyse blood cells and isolate bacteria was first optimised. The manufacturer's recommendation is to use 200 µL of lysis buffer to extract bacteria from 1 mL of positive blood culture for bacterial identification. The results of the hydrolysis assay using 200, 125 and 100 µL of lysis buffer were compared. For most species tested no difference in hydrolytic activity was observed when using different amounts of lysis buffer, except with *A. baumannii* isolates. All *A. baumannii* isolates (14/14) yielded a negative hydrolysis result after being processed with 200 µL of lysis buffer. In contrast, all except one isolate (13/14) yielded a positive hydrolysis result with 100 µL of lysis buffer. Use of 125 µL of lysis buffer produced an intermediate result, with 6/14 isolates yielding a positive result (Fig. 3). Use of <100 µL of lysis buffer led to incomplete lysis of the red blood cells, leading to incorrect spectra acquisition. In an attempt to solve the problem associated with using less lysis buffer, a second washing step was implemented in which the bacterial pellet was washed with the incubation buffer (in addition to the first washing step with the washing buffer provided in the Sepsityper Kit). This yielded better quality spectra.

The imipenem hydrolysis assay was performed under the optimised conditions determined for plate-derived micro-organisms, with minor modifications. A volume of 40 µL of imipenem at a concentration of 0.31 mg/mL was added instead of 50 µL of imipenem at a concentration of 0.25 mg/mL, as used for the plate-derived cells, taking into account that the antibiotic was diluted with the incubation buffer remaining after washing the cell pellet. Following an incubation time of 30 min, hydrolysis of all isolates except two

(79/81) was observed. These isolates were an *E. cloacae* strain harbouring a *bla_{OXA-48}* gene and an *A. baumannii* strain harbouring *bla_{OXA-58}*. When an incubation time of 60 min was used, β -lactamase activity was also observed in these strains. None of the negative isolates (38/38) exhibited carbapenemase activity, and imipenem was not hydrolysed (Supplementary Table S1). Incubation for 30 min yielded an overall sensitivity of 98% (79/81) and a specificity of 100% (79/79). Increasing the incubation time to 60 min yielded 100% sensitivity and specificity. This optimised protocol was subsequently applied to blood cultures obtained from bacteraemic patients. Positive results were observed for all isolates tested (20/20) within 30 min.

4. Discussion

Detection of carbapenemase-producing bacteria directly from blood cultures is a major challenge in clinical microbiology laboratories. Here we describe a novel automated MALDI-TOF/MS-based method for detecting carbapenemase activity in plate-cultured and in blood culture-derived micro-organisms using an imipenem hydrolysis assay.

4.1. Impact of the reaction buffer ranges from false-negative results to high reactivity in the imipenem hydrolysis assay

The results of the research revealed the strong impact of the pH of the incubation buffer on imipenem hydrolysis. Incubation buffers with low pH (e.g. NH_4 -citrate, pH 6) yielded false-negative results in many isolates with OXA-type enzymes. Conversely, the isolates showed high reactivity with an NH_4HCO_3 buffer (pH 8). This confirms previous findings reported by Papagiannitsis et al [18]. Inclusion of 0.005% SDS in the incubation buffer was required to achieve hydrolysis of all *A. baumannii* isolates (by perforation of the membrane owing to the low cell permeability of the bacterium) [26,27].

4.2. Extraction procedure from blood cultures is a key step in the assay

To achieve optimum cell viability, use of 100 μL of lysis reagent (Sepsityper Kit) in the blood culture extraction proved essential to preserve the enzyme activity of the carbapenemases, as the conditions in the original protocol are quite harsh. This was especially apparent in *A. baumannii* strains. Imipenem was hydrolysed within 30 min, thus indicating the advantage of its use relative to other carbapenems with slower reaction times, such as ertapenem and meropenem [20]. Moreover, meropenem requires the use of 2,5-dihydroxybenzoic acid as a matrix to facilitate detection of the hydrolysis products. This matrix renders heterogeneous products, which hinder spectra acquisition [28].

Imipenem hydrolysis was observed after 30 min with most isolates, except one *E. cloacae* and one *A. baumannii*, which required an incubation time of 60 min. The data did not indicate any need for a longer incubation time. Sensitivity and specificity were both 100% for the rapid detection (30 min) of carbapenemase resistance in blood cultures obtained from bacteraemic patients. This demonstrates the ability of the assay to detect carbapenem resistance in clinical samples, especially in areas of high prevalence of *bla_{OXA-48}*-containing isolates, even in mixed bacteraemia. Other isolates with different resistance mechanisms and mixed types of bacteraemia should be tested for full clinical validation of the assay.

4.3. Clinical impact

To our knowledge, this is the first study using a MALDI-TOF/MS-based technique to analyse the hydrolytic capacity of such a large number of bacterial species with different enzyme types and

isolated from positive blood cultures. Although Carvalhaes et al identified carbapenem resistance in 72% of tested isolates from blood cultures within 4 h, most OXA-23-producing *A. baumannii* cannot be identified in <1 day [23]. Ghebremedhin et al identified carbapenem resistance in 65% of *A. baumannii* tested from blood cultures within 4 h [29]. However, comparison of the data obtained in the present study with those obtained by Monteferrante et al yielded similar results for plate-derived isolates [30]. The major advantage of using imipenem in a bicarbonate buffer and automated data processing is shared. However, in this case standardisation of the number of cells and subsequent extraction is favoured against our protocol, which omits this step in order to simplify the procedure and deliver the results as soon as possible to clinicians, having sensitivity and specificity values in the same range [30]. The results of this novel assay set-up are available 30 min after the blood culture has been flagged positive, and the MALDI-TOF/MS preparation and measurement time is no longer than 30 min. The total hands-on time is ca. 1 h, including bacterial extraction, incubation and MALDI-TOF analysis. Another benefit of the assay is that series of blood culture samples can be analysed at the same time, and the turnaround time of the assay is not prolonged by >10 min per sample. The protocol is therefore much faster than phenotypic or genotypic methods, automated systems or the Carba NP test [31,32]. In addition, the MALDI-TOF-based carbapenemase assay for micro-organisms derived from blood cultures yielded a global sensitivity of 98% (confidence interval 0.91–0.99%) and specificity of 100% (confidence interval 0.91–1%), considering all different types of carbapenemases and bacteria.

The data obtained in the present study are comparable with those yielded by molecular methods. Although these methods continue to be the gold standard, they are expensive and difficult to perform and are therefore not currently suitable for most routine clinical laboratories [33].

Comparison of the data obtained in the present study and biochemical tests such as the Carba NP test revealed similar sensitivity and specificity for MBLs and KPC-type enzymes; however, the results obtained for OXA-48-type enzymes demonstrated that the new method is more sensitive (98%) than the Carba NP test, which yields a sensitivity of ca. 80% [34,35]. Moreover, the MBT Compass software enables identification of bacterial species and the carbapenem resistance assay in the same run, programming one spot for identification and another spot for testing carbapenem resistance. This is an advantage not provided by any other molecular, biochemical or phenotypic method. Another advantage of the novel method is that sensitivity and resistance to imipenem are automatically provided by the MBT Compass software, which simplifies the assay and supports the application of this technique by users who are not trained in mass spectrometry.

The MALDI-TOF/MS-based carbapenemase assay performed directly on positive blood cultures is a promising approach for the rapid and reliable detection of carbapenemase activity. The fast diagnosis provided by measuring carbapenemase activity would be helpful for selecting the most appropriate antibiotic therapy in clinical practice, especially in areas with a high prevalence of carbapenemase-producing isolates.

Acknowledgements

The authors thank Francisco Soria Melguizo S.A. (Madrid, Spain) for technical support.

Funding: This work was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria [Grant No. PI12/00512 to GB] and Plan Nacional de I+D and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases [REIPI RD12/0015/0014] co-financed by the

European Development Regional Fund 'A Way to achieve Europe' ERDF. MO is financially supported by the Río Hortega Programme of the ISCIII [CM15/00155].

Competing interests: KS and MK are employees of the mass spectrometry company Bruker Daltonik GmbH (Bremen, Germany). All other authors declare no competing interests.

Ethical approval: Not required.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.08.024.

References

- [1] World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO, <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/>; 2014 [accessed 06.10.16].
- [2] Vali L, Dashti K, Opazo-Caparro AF, Dashti AA, Al Obaid K, Evans BA. Diversity of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* population in a major hospital in Kuwait. *Front Microbiol* 2015;23:743.
- [3] Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:159–77.
- [4] Pfeiffer Y, Schlatterer K, Engelmann E, Schiller RA, Frangenberg HR, Stiewe D, et al. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2125–8.
- [5] Cuzon G, Ouannach L, Condret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2420–3.
- [6] Pitart C, Solé M, Roca J, Fabrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4398–401.
- [7] Potron A, Poirel L, Nordmann P. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:467–71.
- [8] Henig O, Weber G, Hoshen MB, Paul M, German L, Neuberger A, et al. Risk factors for and impact of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection: matched case-control study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34:2063–8.
- [9] Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 2009;136:1237–48.
- [10] Balkan I, Aygün G, Aydın S, Mutcali SI, Kara Z, Kuşkuç M, et al. Blood stream infections due to OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: treatment and survival. *Int J Infect Dis* 2014;26:51–6.
- [11] Lee CH, Su TY, Ye JJ, Hsu PC, Kuo AJ, Chia JH, et al. Risk factors and clinical significance of bacteremia caused by *Pseudomonas aeruginosa* resistant only to carbapenems. *J Microbiol Immunol Infect* 2015;doi:10.1016/j.jmii.2015.06.003. Epub ahead of print.
- [12] Fränkel-Wandel Y, Raveh-Brawer D, Wiener-Well Y, Yinnon AM, Assous MV. Mortality due to *bla_{KPC}* *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:1744.
- [13] Bass SN, Bauer SR, Neuner EA, Lam SW. Impact of combination antimicrobial therapy on mortality risk for critically ill patients with carbapenem-resistant bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3748–53.
- [14] El-Bouri K, Johnston S, Rees E, Thomas I, Bome-Mannathoko N, Jones C, et al. Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br J Biomed Sci* 2012;69:47–55.
- [15] Barba MJ, Fernández A, Oviaño M, Fernández B, Velasco D, Bou G. Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2014;30:126–8.
- [16] Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012;50:927–37.
- [17] Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011;49:3321–4.
- [18] Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer V, Petinaki E, et al. MALDI-TOF MS meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for the direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 2015;53:1731–5.
- [19] Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 2015;53:2163–71.
- [20] Oviaño M, Barba MJ, Fernández B, Ortega A, Aracil B, Oteo J, et al. Rapid detection of OXA-48-producing Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF). *J Clin Microbiol* 2015;54:754–9.
- [21] Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mourinho C, Bou G. Rapid detection of Enterobacteriaceae producing extended spectrum β -lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:1146–57.
- [22] Jung J, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2014;52:924–30.
- [23] Carvalhaes CG, Cayó R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D, et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother* 2014;68:2132–6.
- [24] Pérez-Pérez J, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002;40:2153–62.
- [25] Oteo J, Saez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Hernández-Molina JM, Pérez-Vázquez M, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Spain in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:6344–7.
- [26] Van Looveren M, Goossens H, ARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:684–704.
- [27] Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1210–15.
- [28] Horneffer V, Strupat K, Hillenkamp F. Localization of noncovalent complexes in MALDI-preparations by CLSM. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006;17:1599–604.
- [29] Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016;15:5.
- [30] Monteferrante CG, Sultan S, Ten Kate MT, Dekker LJ, Sparbier K, Peer M, et al. Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF. *J Antimicrob Chemother* 2016;71:2856–67.
- [31] Hombach M, von Gunten B, Castberg C, Bloemberg GV. Evaluation of the Rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2015;53:3828–33.
- [32] Poirel L, Nordmann P. Rapidec Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol* 2015;53:3003–8.
- [33] Kim JS, Kang GE, Kim HS, Kim HS, Song W, Lee KM. Evaluation of Verigene blood culture test systems for rapid identification of positive blood cultures. *Biomed Res Int* 2016;2016:1081536.
- [34] Tijet N, Boyd D, Patel S, Mulvey M, Melano R. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:4578–80.
- [35] Chong P, McCorrister S, Unger M, Boyd D, Mulvey M, Westmacott G. MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of Enterobacteriaceae spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods* 2015;111:21–3.

CAPÍTULO 3.4.

Artículo 4: Imipenem-avibactam: una nueva combinación para la detección de la actividad carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* y *A. baumannii* a través de Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

La proliferación de las enzimas carbapenemasas en *Enterobacteriaceae* y *A. baumannii* ha creado una alerta sanitaria debido a la dificultad en su detección y control y especialmente a la falta de tratamiento antimicrobiano. Aunque los inhibidores de β -lactamasas han jugado un importante papel combatiendo estas resistencias en bacterias gram-negativas, su efectividad ha disminuido a medida que han ido emergiendo nuevas β -lactamasas. Es por ello, que se están desarrollando nuevos inhibidores con el propósito de restaurar la actividad de los antibióticos β -lactámicos en *Enterobacteriaceae* especialmente para productores de carbapenemasas.

El avibactam es un inhibidor de amplio espectro, capaz de inhibir a las carbapenemasas de clase A, B y a algunas de clase D de Ambler, especialmente OXA-48. Numerosas publicaciones han confirmado la actividad *in-vitro* de la combinación ceftazidima-avibactam, mientras que ya se están desarrollando otras posibles combinaciones como ceftarolina-avibactam y aztreonam-avibactam con resultados prometedores.

Con el propósito de continuar evaluando nuevas combinaciones de antibiótico β -lactámico con inhibidores de β -lactamasas, nos proponemos evaluar la actividad de la combinación imipenem-avibactam en EM para identificar aislados productores de carbapenemasas. Para ello, analizamos una serie de 131 aislados caracterizados genotípicamente. Entre ellos, un total de 115 *Enterobacteriaceae*: 79 de ellas portadores de una enzima carbapenemasa (15 bla_{KPC} , 7 bla_{NDM} , 11 bla_{IMP} , 12 bla_{VIM} y 34 bla_{OXA-48}) y 16 *A. baumannii*: 15 de ellos portadores de carbapenemasas (10 bla_{OXA-23} , 2 bla_{OXA-58} , 2 bla_{OXA-24} , 1 $bla_{OXA-237}$). El resto de los aislados fueron no productores de carbapenemasas y se utilizaron como controles negativos.

Los aislados se sometieron a una evaluación en paralelo de imipenem e imipenem-avibactam y posterior análisis mediante el método automatizado MBT Compass software en el módulo STAR-BL (Bruker Daltonik, Germany).

En la primera parte del estudio, se optimizó la concentración de avibactam necesaria para obtener una inhibición completa de la actividad carbapenemasa. Para ello se evaluó la utilización de 1.5, 3 y 4 mg/ml de avibactam frente a la concentración fija de 0.25 mg/ml de imipenem. En la segunda parte, se estudió la actividad del imipenem en paralelo con la actividad de la combinación imipenem-avibactam previamente establecida sobre la totalidad de aislados clínicos.

Después de un tiempo de incubación de 30 min, se observó la hidrólisis del imipenem en todos los aislados excepto en dos *A. baumannii* productores de OXA-58. La sensibilidad y especificidad para la detección de la actividad carbapenemasa sobre el imipenem fue del 98% y 100% respectivamente.

En cuanto a la inhibición por el avibactam, se estableció una concentración de 4 mg/ml de avibactam para alcanzar una inhibición completa. Una concentración menor, no garantiza la inhibición de la actividad hidrolítica sobre el imipenem.

Utilizando esta concentración en el ensayo sobre las cepas clínicas, se obtuvo una disminución de la razón de hidrólisis del imipenem para las enzimas de tipo KPC y OXA-48, consiguiendo restaurar completamente la actividad del imipenem, encontrándose de nuevo dentro del rango de sensibilidad. La comparación entre el logRQ del imipenem y de la combinación imipenem-avibactam para las distintas carbapenemasas, no mostró ninguna diferencia entre las enzimas de tipo KPC y OXA-48. Para ambas enzimas los valores de hidrólisis estaban entre 1 y 1.5. De igual modo ocurrió en la inhibición, comprendiéndose los valores entre 0 y 0.5. Para ambas enzimas la sensibilidad y especificidad fue del 100%.

El efecto opuesto se encontró para las metalo- β -lactamasas, en las que la adición del avibactam, no tuvo efecto ninguno sobre la actividad del imipenem, encontrándose en todos los casos una hidrólisis total del antibiótico. Para las enzimas de tipo OXA pertenecientes a *A. baumannii* el avibactam no demostró tampoco un efecto inhibitorio claro, obteniéndose un patrón inconsistente, con aumentos y disminuciones aleatorias de la actividad del imipenem.

Accepted Manuscript

Imipenem-avibactam: a novel combination for the rapid detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)

Marina Oviaño, Germán Bou

PII: S0732-8893(16)30343-1
DOI: doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.016](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.016)
Reference: DMB 14223

To appear in: *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*

Received date: 1 August 2016
Revised date: 13 September 2016
Accepted date: 14 October 2016



Please cite this article as: Oviaño Marina, Bou Germán, Imipenem-avibactam: a novel combination for the rapid detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* (2016), doi: [10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.016](https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.016)

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

**Imipenem-avibactam: a novel combination for the rapid detection of carbapenemase activity
in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* by Matrix-Assisted Laser Desorption
Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)**

Marina Oviaño¹ and Germán Bou^{1,#}

¹ Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. As Xubias s/n.
15006, La Coruña. Spain

Running title: IMI-AVI for CPE detection by MALDI-TOF MS

Word count of the abstract: 148; Word count of the body of the text: 2204

[#]Address for correspondence:

Germán Bou

Servicio de Microbiología

Complejo Hospitalario Universitario A Coruña

Xubias de Arriba s/n, 3ª Planta Ed. Sur

15006 La Coruña, Spain

Phone: +34 981-176087

Fax: +34 981-176097

E-mail: german.bou.arevalo@sergas.es; german.bou@usc.es

Abstract:

In the present study, we propose a novel MALDI-TOF-MS-based method for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. For this, we analysed a series of 131 isolates. Among them, a total of 115 *Enterobacteriaceae*: 79 of them carrying a carbapenemase enzyme (15 bla_{KPC} , 7 bla_{NDM} , 11 bla_{IMP} , 12 bla_{VIM} and 34 bla_{OXA-48}) and 16 *Acinetobacter baumannii* isolates: 15 of them carrying carbapenemases (10 bla_{OXA-23} , 2 bla_{OXA-58} , 2 bla_{OXA-24} , 1 $bla_{OXA-237}$). The rest of the isolates were non-carbapenemase producers and used as negative controls. The isolates were submitted to susceptibility testing using a combination of imipenem-avibactam and analysis by the MALDI-TOF Biotyper Compass software (Bruker Daltonik, Germany). The assay showed an overall sensitivity and specificity for carbapenemase detection of respectively 98% and 100%. The combination of imipenem and avibactam displayed activity against KPC and OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* and thus represents a new strategy for identifying and confirming these carbapenemases. However, the combination did not provide any benefit over *Acinetobacter baumannii*.

Key words: Imipenem, avibactam, MALDI-TOF, antimicrobial resistance detection.

1. Introduction:

The spread of carbapenemase enzymes in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* has led to an emerging health concern because of the difficulty in detection and control [1,2] and especially because of the lack of adequate antimicrobial therapy [3]. Although β -lactamase inhibitors have played an important role in combating β -lactam resistance in Gram-negative bacteria, their effectiveness has diminished as diverse varieties of β -lactamases have emerged. Novel β -lactamase inhibitors are being developed with the aim of restoring the activity of β -lactam antibiotics against carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [4,5]. Avibactam displays potent, broad-spectrum inhibition of Ambler class A and class C β -lactamases and some inhibitory capacity against class D enzymes [6]. The ceftazidime-avibactam (CAZ-AVI) combination has recently undergone testing and further studies are currently under way [7]. Numerous publications have confirmed the *in vitro* effectiveness of the CAZ-AVI combination against CTX-M, KPC and OXA-48-type producers [8-10] and the poor activity towards OXA-10 and OXA-24-producers [11,12]. Other combinations with avibactam are being developed, and e.g. ceftaroline-avibactam and aztreonam-avibactam show promising results [13,14].

MALDI-TOF MS has become an established tool for the rapid identification of microorganisms in microbiological laboratories [15-17]. The technique has recently proved useful for detecting β -lactamase activity, based on monitoring the mass peaks of the hydrolyzed and non-hydrolyzed forms of the antibiotics, which differ in their molecular weight [18-23].

With the aim of continuing the evaluation of new effective combinations of β -lactams and avibactam, we developed a novel approach for the detection of carbapenemase-producing isolates using an imipenem-avibactam (IMI-AVI) assay with a series of 131 bacterial isolates, 94 of which are carbapenemase producers. Carbapenemase resistance can be detected after 30 min incubation with imipenem and further evaluation with an automated software algorithm

(MALDI-TOF Biotyper Compass software, Bruker Daltonik). Imipenem was chosen as the antibiotic marker for carbapenem resistance as it displays broad spectrum activity against both *Enterobacteriaceae* and *A. baumannii*, and it also shows to our concern the highest turnover rate of β -lactam hydrolysis. This approach makes use of the capacity of avibactam to inhibit imipenem hydrolysis towards different types of carbapenemase producers in an assay with *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* and rapid detection by MALDI-TOF MS.

2. Material and methods

2.1. Bacterial isolates

A total of 131 previously characterized non-repeat *Enterobacteriaceae* and *A. baumannii* isolates from Spain were tested (supplementary material). Of the 115 *Enterobacteriaceae* isolates, 79 expressed a carbapenemase enzyme (15 bla_{KPC} , 7 bla_{NDM} , 11 bla_{IMP} , 12 bla_{VIM} and 34 bla_{OXA-48}) and the other 36 isolates, which expressed resistance mechanisms other than carbapenemases, were used as negative controls. These controls comprised 9 β -lactamase-producing isolates (4 bla_{SHV} and 5 bla_{K1}), 12 AmpC-type (3 bla_{EBC} , 1 bla_{FOX} , 3 bla_{CMY} and 5 bla_{DHA}), 14 ESBL-type (14 $bla_{CTX-M-type}$) isolates and one isolate that remained fully susceptible to cephalosporins and did not express AmpC-type, ESBL-type or any other β -lactamase or carbapenemase enzyme. Of the 16 *Acinetobacter baumannii* isolates included in the study, 15 of them expressed carbapenemases (10 bla_{OXA-23} , 2 bla_{OXA-58} , 2 bla_{OXA-24} , 1 $bla_{OXA-237}$) and one isolate was fully susceptible to all antibiotics. The *Enterobacteriaceae* isolates comprise 66 *Klebsiella pneumoniae*, 11 *K. oxytoca*, 17 *Escherichia coli*, 18 *Enterobacter cloacae*, 1 *E. aerogenes* and 2 *C. freundii*. All strains were characterized in relation to carbapenemases, ESBLs and AmpC-type enzymes by PCR and sequencing.

2.2. MBT STAR-BL assay

The MALDI Biotyper Selective Testing of Antibiotic Resistance β -lactamase (MBT STAR-BL) assay was performed as described by Sparbier *et al* [18]. Briefly, for analysis of plated bacteria, a one- μ l loop of bacteria was re-suspended in 50 μ l of reaction buffer. Bacteria were evaluated simultaneously in a solution containing imipenem (0.25 mg/ml, Sigma-Aldrich, Germany; 10mM NH_4HCO_3 , 0.005% SDS, pH 8.0) [24] and in a solution containing the combined IMI-AVI solution (25 μ l of imipenem 0.50 mg/ml and 25 μ l of avibactam; 10mM NH_4HCO_3 , 0.005% SDS, pH 8.0). The final concentration of imipenem in the combined antibiotic solution was maintained so that the hydrolysis rate of the isolates in the combined solution could be compared with the imipenem solution alone. The influence of the concentration of avibactam (AstraZeneca AB, Sweden: 1.5, 3 and 4 mg/ml) was also evaluated. The bacteria and antibiotic solutions were incubated at 37°C for 30 min under agitation.

2.3. MALDI-TOF MS analysis

For MALDI-TOF MS measurements, duplicate samples (1 μ l) of the supernatant were spotted directly onto a polished steel MALDI target plate. Dried spots were overlaid with MALDI matrix (10 mg/ml of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [α -HCCA] in 50% acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid; Bruker Daltonik, Germany) containing a modified reserpine represented by the mass of 607.26 Da as an internal standard. Once the matrix was dry, mass spectra were acquired in a microflex LT/SH bench-top mass spectrometer (Bruker Daltonik, Germany) equipped with a 60 Hz nitrogen laser. Measurements were made in the mass range between 100 and 1000 Da by employing an optimized acquisition imipenem method in the STAR-BL module in FlexControl 3.3 (Bruker Daltonik GmbH, Germany).

2.4. Data evaluation

MALDI-TOF Biotyper Compass software (Bruker Daltonik, Germany) was used to evaluate the spectra. The software automatically calculates the LogRQ value (which indicates the rate of hydrolysis) for imipenem as the logarithmic ratio of the intensity of the internal

standard peak and the intensity of the non-hydrolyzed imipenem. LogRQ values were normalized according to defined negative and positive control strains. Normalized LogRQ values similar to or below 0.2 represent negative strains. Normalized LogRQ values similar to or above 0.4 indicate β -lactamase activity. Normalized LogRQ values between 0.2 and 0.4 represent an ambiguous hydrolysis pattern which requires further testing.

3. Results

3.1. Imipenem performance for carbapenemase detection

Imipenem performance has previously been optimized in a paper by our group [24]. Following these conditions, we performed the assay. After incubation of isolates for 30 min, we observed imipenem hydrolysis in all except two *A. baumannii* *bla*_{OXA-58} strains. These results can be explained by the lower carbapenems MICs than these isolates use to display comparing to other *A. baumannii* OXA enzymes. The sensitivity and specificity imipenem hydrolysis assay were respectively 98 % (92/94) and 100 % (37/37).

3.2. Optimization of the concentration of avibactam

The reaction conditions were optimized in relation to the concentration of avibactam required for inhibition of imipenem hydrolysis and a proper MALDI-TOF MS spectra acquisition. For this purpose, we performed the β -lactamase assay with a set of 8 isolates chosen at random from those expressing a KPC or OXA-48-type carbapenemase enzyme, in the presence of three different concentrations of avibactam (1.5, 3 and 4 mg/ml) (Fig. A). Use of 1.5 mg/ml of avibactam resulted in poor inhibition of imipenem hydrolysis. The logRQ value for imipenem hydrolysis decreased but was still higher than 0.4 for almost all (7/8) isolates. Use of 3 mg/ml avibactam yielded a logRQ value of between 0.1 and 0.4 for all isolates, indicating

ambiguous inhibition that results in a substantial decrease in imipenem hydrolysis but that is not sufficient to ensure complete inhibition. Finally, use of 4 mg/ml avibactam led to complete inhibition of imipenem hydrolysis in all the isolates tested (8/8), ensuring activity of the antibiotic.

Figure A. Influence of the concentration of avibactam on imipenem hydrolysis

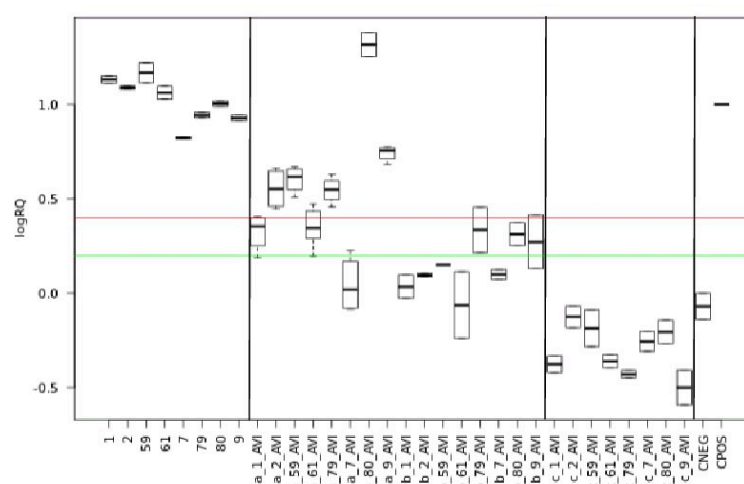


Fig. A. Normalized imipenem LogRQ values for the isolates incubated with imipenem (0.25 mg/ml, Sigma-Aldrich, Germany; 10mM NH_4HCO_3 , 0.005% SDS, pH 8.0) and for the isolates incubated with imipenem plus different concentrations of avibactam: (a) 1.5 mg/ml; (b) 3 mg/ml and (c) 4mg/ml. CNEG and CPOS represent negative and positive controls respectively.

3.3. Avibactam inhibition assay

The inhibition assay was performed with 4 mg/ml of avibactam. Under these previously optimized conditions, we observed significant modification of the imipenem hydrolysis ratio when the combined IMI-AVI solution was applied to KPC-type enzymes (Fig. B; supplementary material). In all isolates tested (15/15), avibactam was able to inhibit the hydrolytic effect of the enzyme, thus restoring the imipenem activity. In all cases, the IMI-AVI logRQ value was below 0.2 and the average value was -0.2 when avibactam was applied to the reaction solution. The opposite effect was observed in the isolates expressing metallo- β -lactamases (Fig. B; supplementary material). In all cases, the IMI-AVI logRQ value was higher than 0.8 and the average value was 1.3 (supplementary material), so in this case the avibactam was unable to inhibit the action of the metallo- β -lactamases on imipenem (0/30). For group D carbapenemase enzymes, the behaviour differed depending on the type of β -lactamase. Avibactam was able to inhibit the action of OXA-48-type enzymes, and the IMI-AVI logRQ value was below 0.2 in all cases (34/34) and the average value was -0.3 (Fig. B; supplementary material). For other OXA-type enzymes (other than *bla*_{OXA-48}) belonging to *A. baumannii*, the opposite result was obtained, and avibactam was unable to inhibit the hydrolytic effect of these enzymes (Fig. B; supplementary material). The IMI-AVI logRQ value was above 0.4 in all cases (13/13) and the average value was 0.8. The average decrease in imipenem hydrolysis in the presence of avibactam was 0.1, indicating that the logRQ values for the isolates in presence and absence of avibactam were almost the same, and imipenem hydrolysis was not reduced. None of the negative controls displayed a positive hydrolysis reaction in the MALDI-TOF MS based imipenem assay (supplementary material).

Comparison of the IMI logRQ and the IMI-AVI logRQ values for the different types of carbapenemases (Fig. B; supplementary material) did not reveal any difference between KPC

and OXA-48-type enzymes. Both families of enzymes are capable of hydrolyzing imipenem following a similar pattern, and the IMI logRQ value was between 1 and 1.5. The same was observed for the inhibition, and the IMI-AVI logRQ value was between 0 and 0.5. The IMI logRQ value for the metallo- β -lactamase enzymes was within the same range as for the KPC and OXA-48 enzymes; however, as indicated above, the IMI-AVI logRQ value did not decrease and was again the same range, overlapping the values of the hydrolysis rates. For *A. baumannii* carbapenemases, the IMI logRQ value decreased slightly relative to those of the other carbapenemases, and the IMI-AVI logRQ values were variable and no clear pattern could be established. The latter values remained the same, decreased or increased, thus indicating the lack of a consistent pattern, but in any case assuring the capability of a proper inhibition by avibactam.

Figure B. Comparison of the LogRQ values for the different isolates under study

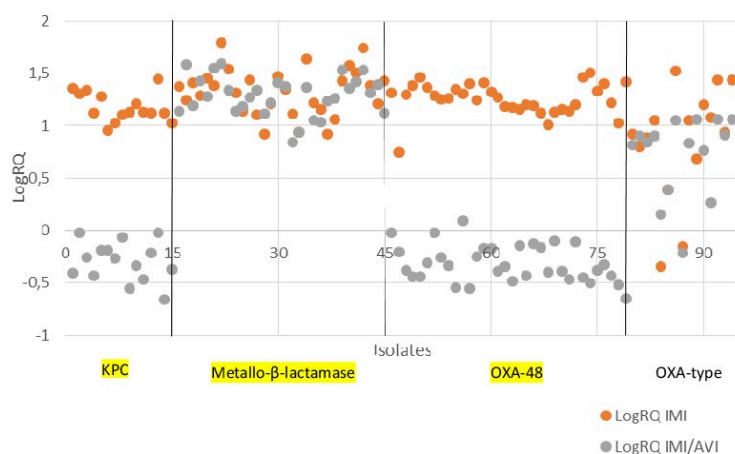


Fig B. Normalized LogRQ values for 94 carbapenemase-producing isolates after incubation for 30 min with imipenem (0.25 mg/ml, Sigma-Aldrich, Germany; 10mM NH_4HCO_3 , 0.005% SDS, pH

8.0) (LogRQ IMI) and with imipenem/ avibactam (0.25 mg/ml imipenem, Sigma-Aldrich, Germany; 4 mg/ml avibactam, AstraZeneca AB, Sweden; 10mM NH_4HCO_3 , 0.005% SDS, pH 8.0) (LogRQ IMI-AVI). The KPC, metallo- β -lactamase and OXA-48-type enzymes belong to *Enterobacteriaceae* isolates and the OXA-type enzymes belong to *A. baumannii*. (Precise imipenem logRQ values and the complete description of the isolates are included in the supplementary material)

4. Discussion

We report a novel approach to the functional β -lactamase assay by using MALDI-TOF MS to detect carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* and *A. baumannii* in an imipenem hydrolysis assay and utilizing the inhibitory activity of avibactam in response to Ambler class A and D carbapenemases. Our findings support previous data concerning the use of the β -lactamase assay to detect carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* and *A. baumannii* [18-20,23]. Evaluation of the activity of the imipenem-avibactam (IMI-AVI) combination against carbapenemase-producing isolates revealed for the first time its promising use in mass spectrometry as a new and rapid confirmation strategy to detect KPC and OXA-48-producing *Enterobacteriaceae*. Avibactam did not inhibit the carbapenemase activity in any of the *A. baumannii* isolates, leading to an inconsistent pattern of imipenem hydrolysis. The study findings support and extend those reported by Akta[®] *et al.*, who studied the in vitro activity of IMI-AVI in OXA-48 *K. pneumoniae* and in OXA-51 and OXA-58 *A. baumannii* [10]. Lapuebla *et al.* tested the activity of imipenem with relebactam, another β -lactam inhibitor, in a susceptibility study against KPC-producing *K. pneumoniae* and OXA-23 *A. baumannii* and also obtained similar results [25].

The overall sensitivity and specificity of the MALDI-TOF MS assay for carbapenemase detection were respectively 98% and 100%, considering all different types of carbapenemases and bacteria. The MALDI-TOF MS assay showed 100% sensitivity and specificity for detecting KPC and OXA-48-type isolates through avibactam inhibition. Besides, if we combine this assay with temocillin hydrolysis [23], OXA-48-type isolates could be identified with 100% sensitivity and specificity.

The MALDI-TOF Biotyper Compass software (Bruker Daltonik, Germany) provided automatic analysis of imipenem hydrolysis. Therefore, detailed analysis at the spectra level is not required, which simplifies the assay and supports the application by personnel who are not trained in mass-spectrometry techniques. Besides, this novel software allows for the first time that bacterial identification and detection of antimicrobial resistance can be performed in the same run and target plate within 30 min, being a cost-effective method ready for implementation in clinical microbiology laboratories.

Our data strongly support the possible use of the IMI-AVI combination in a future therapeutic regime, as the addition of avibactam improves the activity of imipenem in *Enterobacteriaceae* isolates. In the future MALDI-TOF MS could be used as a promising tool for evaluating the activity of β -lactam inhibitors, correlating the logRQ results with the MIC of the antibiotic and opening a new way to investigate effective combinations of β -lactam plus inhibitors. The findings also highlight the importance of the MALDI-TOF MS based carbapenemase assay to provide rapid and reliable detection of carbapenemases in a clinical workflow.

Acknowledgements

We thank Francisco Soria-Melguizo, S. A. Spain, for technical support and AstraZeneca AB, Sweden for providing us with avibactam. We would especially like to thank Markus Kostrzewa

(Bruker Daltonik, Germany) for support with this project and Katrin Sparbier (Bruker Daltonik, Germany) for invaluable assistance.

Funding

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria (grant number PI15/00860 to GB); Plan Nacional de I+D and Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) co-financed by European Development Regional Fund “A Way to achieve Europe” ERDF. M. Oviaño is financially supported by the Río Hortega Programme of the ISCIII (CM15/00155).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. World Health Organization (2014) Antimicrobial resistance: global report on surveillance. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance/en/>
2. Nordmann P, Poirel L (2014) The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 20: 821-30.
3. Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P (2013) Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: the state of the art. *Expert Rev Anti Infect Ther* 11: 159-77.
4. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA (2014) New β -lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1835–46.

5. Toussaint KA, Gallagher JC (2015) β -Lactam/ β -lactamase inhibitor combinations: from then to now. *Ann Pharmacother* 49:86–98.
6. Zhanel GG, Lawson CD, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Lagacé-Wiens PR, Denisuik A, Rubinstein E, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP 3rd, Karlowsky JA (2013) Ceftazidime–avibactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination. *Drugs* 73: 159–77.
7. Mazuski JE, Gasink LB, Armstrong J, Broadhurst H, Stone GG, Rank D, Llorens L, Newell P, Pacht J (2016) Efficacy and safety of Ceftazidime-Avibactam plus metronidazole versus meropenem in the treatment of complicated intra-abdominal infection: results from a randomized, controlled, double-blind, phase 3 program. *Clin Infect Dis* Jun 62: 1380-9.
8. Sader HS, Castanheira M, Flamm RK, Farrell DJ, Jones RN (2014) Antimicrobial activity of ceftazidime-avibactam against Gram-negative organisms collected from U.S. medical centers in 2012. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1684–1692.
9. Levasseur P, Girard AM, Miossec C, Pace J, Coleman K (2015) In vitro antibacterial activity of the ceftazidime-avibactam combination against *Enterobacteriaceae*, including strains with well-characterized β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 5:1931-4
10. Aktaş Z, Kayacan C, Oncul O (2012) In vitro activity of avibactam (NXL104) in combination with β -lactams against Gram-negative bacteria, including OXA-48 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 39:86-9.
11. Lahiri SD, Mangani S, Jahic H, Benvenuti M, Durand-Reville TF, De Luca F, Ehmann DE, Rossolini GM, Alm RA, Docquier JD (2015) Molecular basis of selective inhibition and slow reversibility of avibactam against class D carbapenemases: a structure-guided study of OXA-24 and OXA-48. *ACS Chem Biol* 10:591–600.

12. Ehmann DE, Jahic H, Ross PL, Gu RF, Hu J, Durand-Réville TF, Lahiri S, Thresher J, Livchak S, Gao N, Palmer T, Walkup GK, Fisher SL (2013) Kinetics of avibactam inhibition against Class A, C, and D β -lactamases. *J Biol Chem* 288:27960-71.
13. Li H, Estabrook M, Jacoby GA, Nichols WW, Testa RT, Bush K (2015) In vitro susceptibility of characterized β -lactamase-producing strains tested with avibactam combinations. *Antimicrob Agents Chemother* 59:1789–93
14. Bush K (2015) A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *Int J Antimicrob Agents*. 46:483-93.
15. El-Bouri K, Johnston S, Rees E, Thomas I, Bome-Mannathoko N, Jones C, Reid M, Ben-Ismaeil B, Davies AR, Harris LG, Mack D (2012) Comparison of bacterial identification by MALDI-TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods: agreement, speed and cost implications. *Br J Biomed Sci* 69:47-55.
16. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti JL, Ferroni A, Gutmann L, Nassif X (2011) MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* 44: 104-9.
17. Barba MJ, Fernández A, Oviño M, Fernández B, Velasco D, Bou G (2014) Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 30: 126-8
18. Sparbier K, Schubert S, Weller U, Boogen C, Kostrzewa M (2012) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 50: 927-37
19. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J (2015) MALDI-TOF MS meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for the direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 53:1731-5

20. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G (2015) Efficient Detection of Carbapenemase Activity in *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in less than 30 Minutes. *J Clin Microbiol* 53:2163-71.
21. Oviaño M, Fernández B, Fernández A, Barba MJ, Mouriño C, Bou G (2014) Rapid detection of *Enterobacteriaceae* producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 20: 1146-57
22. Jung J, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S (2014) Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. *J Clin Microbiol* 52: 924-30
23. Oviaño M, Barba MJ, Fernández B, Ortega A, Aracil B, Oteo J, Campos J, Bou G (2016) Rapid detection of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF). *J Clin. Microbiol* 54 :754-9
24. Oviaño M, Sparbier K, Barba MJ, Kostrzewa M, Bou G (2016) Universal protocol for the rapid automated detection of carbapenem resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) *Int J Antimicrobiol Ag* [In Press]
25. Lapuebla A, Abdallah M, Olafisoye O, Cortes C, Urban C, Landman D, Quale J (2015) Activity of imipenem with relebactam against gram-negative pathogens from New York City. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5029-31.

CAPÍTULO 3.5.

Artículo 5: Detección rápida del determinante de resistencia AAC(6')-Ib-cr mediado por plásmidos en *Enterobacteriaceae* a través de MALDI-TOF MS

Las fluoroquinolonas se encuentran entre los antimicrobianos más prescritos en el mundo. La resistencia a fluoroquinolonas tiene lugar principalmente como resultado de mutaciones en los genes cromosómicos codificantes de la ADN girasa y la topoisomerasa IV. También se han descrito 3 mecanismos de resistencia mediados por plásmidos (PMQR): (i) las proteínas Qnr, que protegen la diana de las quinolonas ; (ii) la enzima AAC(6')-Ib-cr; y (iii) las bombas de expulsión QepA y OqxAB.

La enzima AAC(6')-Ib-cr es una variante de una acetiltransferasa AAC(6')-Ib muy común que confiere resistencia a aminoglucósidos. Este enzima modificada expande su espectro de actividad sobre las quinolonas, ciprofloxacino y norfloxacino.

Este mecanismo de resistencia plasmídico, proporciona sólo un nivel bajo de resistencia que por sí mismo, no excede la categoría clínica de susceptibilidad, pero que a su vez facilita la selección de mutaciones de resistencia durante el tratamiento y que hace que las infecciones con patógenos que contengan PMQR sean más difíciles de tratar. Además, la asociación cercana entre resistencia a fluoroquinolonas y resistencia a otros agentes antimicrobianos, especialmente β -lactámicos y aminoglicósidos, se plantea como un nuevo problema en el manejo de estas infecciones.

En el caso de los aislados portadores de este nuevo mecanismo de resistencia, los tests genotípicos son necesarios para detectar estos determinantes, ya que no hay tests fenotípicos que sean capaces de identificarlos. En este estudio tratamos de utilizar la tecnología MALDI-TOF MS para detectar esta enzima de resistencia AAC(6')-Ib-cr, que es el mecanismo de resistencia a fluoroquinolonas más prevalente entre los mediados por plásmidos en *Enterobacteriaceae*. Para ello, medimos la actividad acetiltransferasa sobre ciprofloxacino y norfloxacino, utilizando el levofloxacino como control negativo, ya que este antibiótico no es sustrato para la enzima. La acetilación corresponde a un incremento de masas de 43 Da, que puede ser fácilmente detectable mediante MALDI-TOF MS después de la incubación de la bacteria con el antibiótico.

En un primer paso de optimización del método, se estudió una colección de 81 cepas de *E. coli* isogénicas que derivan de *E. coli* ATCC 25922, portadoras de mecanismos de resistencia cromosómicos (incluyendo modificaciones en *gyrA*, *parcC* o la delección *marC*), mecanismos resistencia plasmídicos como Qnr y AAC(6')-Ib-cr ó la bomba de expulsión mediada por plásmidos QepA2. En la segunda parte del estudio evaluamos a ciegas el proceso previamente optimizado sobre 36 aislados clínicos con distintas combinaciones de mecanismos de resistencia a quinolonas.

Se estudiaron y describieron los espectros de masas de cada uno de los antibióticos, con su correspondiente metabolito acetilado después de 30 min de incubación. La clasificación entre sensible y resistente se realizó por inspección visual de los picos de masas descritos en el espectro. Para ello, las intensidades de los picos correspondientes a las formas acetiladas se compararon con las formas sin acetilar. Los aislados se clasificaron como no portadores de AAC(6')-Ib-cr, si la intensidad de las distribuciones del antibiótico eran similares a las del control negativo. Los aislados fueron clasificados como portadores de AAC(6')-Ib-cr si las intensidades de las formas acetiladas representaban el 50% o más de las intensidades de las formas no acetiladas.

Los aislados portadores de la enzima AAC(6')-Ib-cr tanto de los controles como de las cepas clínicas caracterizadas mediante biología molecular, mostraron resistencia frente a ciprofloxacino y norfloxacino. El resto de los aislados no portadores de la enzima AAC(6')-Ib-cr no modificaron los antibióticos. Los aislados portadores de otros mecanismos de resistencia a quinolonas, incluyendo modificaciones en *gyrA*, *parC*, la detección *marR* o el mecanismo de resistencia mediado por plásmidos Qnr, no afectaron a los antibióticos ni a la interpretación del resultado mediante MALDI-TOF MS.

Ninguno de los aislados testados mostró una desaparición total de las formas no acetiladas del antibiótico, coexistiendo ambas formas acetiladas y no acetiladas en el mismo espectro. Un tiempo de incubación prolongado no condujo tampoco a la observación exclusiva de formas acetiladas. Este hecho va en consonancia con la actividad de la enzima, que sólo produce un nivel bajo de resistencia de acuerdo a los estudios cinéticos y de CMI expresados por estos aislados estudiados previamente. El espectro de masas correspondiente a levofloxacino no se modificó por la enzima AAC(6')-Ib-cr en

ningún caso, permaneciendo los picos de masas intactos. La sensibilidad y la especificidad del ensayo fue del 100% para un tiempo de incubación de 30 min.

**Rapid detection of the plasmid-mediated quinolone
resistance determinant AAC(6')-Ib-cr in Enterobacteriaceae
by MALDI-TOF MS analysis**

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID:	JAC-2016-1656.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Oviaño, Marina; Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Microbiología Rodríguez-Martínez, Jose; Univ. Sevilla, Microbiology Pascual, Alvaro; Hospital Universitario Virgen Macarena, Microbiología Bou, Germán; Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, Microbiology
Keywords:	plasmid-mediated quinolone resistance, MALDI-TOF, Enterobacteriaceae, Antimicrobial resistance

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2 **Rapid detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *AAC(6')*-*Ib-cr* in**
3 **Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS analysis**

4 Marina OVIAÑO¹, Jose Manuel RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ², Álvaro PASCUAL^{2,3} and Germán BOU^{1,#}

5 ¹ Servicio de Microbiología. Complejo Hospitalario Universitario A Coruña. As Xubias s/n.
6 15006, La Coruña. Spain

7 ²Departamento de Microbiología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

8 ³Unidad Intercentros de Enfermedades Infecciosas, Microbiología y Medicina Preventiva,
9 Hospital Universitario Virgen Macarena y Virgen del Rocío, Sevilla, Spain

10

11 **Running title:** Detection of *AAC(6')*-*Ib-cr*-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS

12

13

14

15 [#]Address for correspondence:

16 Germán Bou

17 Servicio de Microbiología

18 Complejo Hospitalario Universitario A Coruña

19 Xubias de Arriba s/n, 3ª Planta Ed. Sur

20 15006 La Coruña, Spain

21 Phone: +34 981-176087

Fax: +34 981-176097

22 E-mail: german.bou.arevalo@sergas.es; german.bou@usc.es

23 **Abstract:**

24 **Objective:** Rapid detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant
25 *AAC(6')-Ib-cr* enzyme in Enterobacteriaceae by measuring the acetyltransferase activity over
26 fluoroquinolones by MALDI-TOF MS analysis.

27 **Methods:** The presence of the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme was determined by mass spectrometry by
28 measuring the acetyltransferase activity of a collection of 81 isogenic *Escherichia coli* control
29 strains, 10 carrying the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme during exposure to ciprofloxacin, norfloxacin and
30 levofloxacin and further analysis of 36 clinical isolates, 25 carrying the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme in
31 addition to different combinations of quinolone resistance mechanisms. The effect of
32 acetylation yields an increase of 43 Da in the mass of ciprofloxacin and norfloxacin, but not of
33 levofloxacin, that can be observed by visual inspection of the mass peaks in the spectra.

34 **Results:** Based on the characteristic peak pattern for the acetylated and nonacetylated forms
35 of ciprofloxacin and norfloxacin, a clear differentiation between *AAC(6')-Ib-cr*-producing
36 isolates and non-producing isolates was detected after an incubation time of 30 min, both in
37 the isogenic control strains as in clinical isolates. Levofloxacin was found intact. A 100%
38 agreement was found between the MALDI-TOF-MS-based assay and the results of the
39 molecular characterization of the tested isolates.

40 **Conclusions:** MALDI-TOF is an outstanding method for detection of the *AAC(6')-Ib-cr*-enzyme
41 in clinical samples. The method is easy to perform and not time-consuming, as analytical
42 results can be obtained within minutes. For the first time, MALDI-TOF has been used to detect
43 resistance promoted by enzymatic modification of the antibiotic aside from β -lactamases,
44 expanding the capacity of analysis into new families of antibiotics.

45

46

47 **Introduction:**

48 Fluoroquinolones (FQ) are among the most frequently prescribed antimicrobial agents
49 worldwide. Fluoroquinolone resistance (FQR) occurs mainly as a result of mutations in
50 chromosomal genes encoding the quinolone targets DNA gyrase and topoisomerase IV.¹ Three
51 plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) mechanisms have also been described: (i) the
52 *Qnr* proteins, which protect the quinolone targets ; (ii) the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme; and (iii) *QepA*
53 and *OqxAB* plasmid-mediated efflux pumps.² The second plasmid-mediated mechanism
54 involves acetylation of quinolones with an appropriate amino nitrogen target (ciprofloxacin
55 and norfloxacin) by a variant of the common aminoglycoside acetyltransferase *AAC(6)-Ib*.³

56 These plasmid-mediated mechanisms provide only low-level resistance that by itself does not
57 exceed the clinical breakpoint for susceptibility, but nonetheless facilitates selection of higher-
58 level resistance during treatment and makes infection by pathogens containing PMQR harder
59 to treat.⁴ Besides, the emergence of a very close association between quinolone resistance and
60 resistance to other antimicrobial agents, particularly β -lactams (generally mediated by
61 extended-spectrum β -lactamases) and aminoglycosides, is a critical problem in managing these
62 infections.⁵⁻⁹

63 In the case of isolates harbouring PMQR, but lacking FQR mutations, molecular tests are
64 needed to detect these determinants, as there are no specific phenotypic tests for the
65 detection of PMQR mechanisms.¹⁰ In the present study, we proposed a rapid Matrix-Assisted
66 Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-based (MALDI-TOF MS) method
67 for detecting the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme by measuring the acetyltransferase activity over
68 ciprofloxacin, norfloxacin and levofloxacin. Acetylation corresponds to a mass shift of 43 Da,
69 which can be easily detected by MALDI-TOF MS after 30 min of incubation of the bacteria to be
70 tested with the given antibiotic.

71 MALDI-TOF MS has become an established tool for the rapid identification of microorganisms
72 in microbiological laboratories.¹¹⁻¹⁴ The technique has recently proved useful for detecting β -
73 lactamase activity with good results.¹⁵⁻²⁰ The present study highlights the ability of MALDI-TOF
74 MS for detecting resistant determinants other than β -lactamases, by applying this
75 methodology to the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme which is the most prevalent plasmid-mediated
76 quinolone resistance mechanism in Enterobacteriaceae.^{5,6}

77

78 **Material and methods**

79 **Bacterial isolates**

80 As a preliminary step to optimize the method, we tested a collection of 81 previously studied
81 isogenic *Escherichia coli* control strains (all derived from *E. coli* ATCC 25922, which is used
82 worldwide for susceptibility testing) carrying combinations of four chromosomally mediated
83 quinolone resistance mechanisms (including modifications in *gyrA* and *parC* or *marR* deletion),
84 plasmid-mediated *Qnr* and *AAC(6')-Ib-cr* genes, or the plasmid-mediated *qepA2* efflux pump
85 (supplementary material, table 1).²¹ Out of the 81 isolates, 10 were *AAC(6')-Ib-cr* producers.

86 In the second part of the study we evaluated the optimized procedure in a series of 36 blinded
87 clinical isolates previously characterized with respect to FQR, 25 of them carrying the *AAC(6')-*
88 *Ib-cr* enzyme with and without other resistance mechanisms attached (including modifications
89 in *gyrA* and *parC* and carrying plasmid-mediated *Qnr*). Among them, 14 were *E. coli* and 22
90 were *Klebsiella pneumoniae*, obtained from a previous multicenter collection (supplementary
91 material, table 2).⁶

92 **MALDI-TOF-MS acetylation assay**

93 The above-mentioned *E. coli* isogenic control strains were grown overnight in Trypticase Soy
94 Agar (TSA) with 5% sheep blood (Becton Dickinson, NY, USA). The assay was performed as
95 described by Sparbier *et al.*¹⁵ Briefly, for analysis of bacteria, a one- μ L loop of bacteria was re-

suspended in 50 μ L of reaction buffer and incubated at 37°C for 30 min. Bacteria were evaluated simultaneously in three different solutions containing ciprofloxacin (0.50 mg/mL, Sigma-Aldrich, Germany), norfloxacin (0.50 mg/mL, Sigma-Aldrich) and levofloxacin (0.50 mg/mL, Sigma-Aldrich). The antibiotics were previously dissolved in 0.1M HCl and diluted to the final concentration in a buffer containing 10mM NH_4HCO_3 and 0.01% SDS to a final pH=6.5. The clinical isolates were evaluated in the same way.

MALDI-TOF MS analysis

For MALDI-TOF MS measurements for detection of the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme, duplicate samples (1 μ L) of the supernatant obtained after incubation of the bacterial pellet with the antibiotic were spotted directly onto a polished steel MALDI target plates. Dried spots were overlaid with 1 μ L MALDI-TOF matrix (10 mg/mL of α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid [α -HCCA] in 50% acetonitrile and 0.1 % trifluoroacetic acid (Bruker Daltonik, GmbH, Germany). Spectra were acquired in a MALDI Microflex LT/SH bench-top mass spectrometer (Bruker Daltonik) equipped with a 60 Hz nitrogen laser in the mass range between 100 and 1000 Da, with a mass peak resolution >300 by employing an optimized acquisition method using FlexControl v.3.0 software.

Data evaluation for detection of *AAC(6')-Ib-cr* enzyme

The acquired MALDI-TOF MS spectra were analyzed with the software Flexanalysis 3.3 (Bruker Daltonik). Spectra were smoothed and the baseline was subtracted (algorithm, TopHat). Peaks were manually selected with the following parameter settings: peak detection algorithm, snap; signal-to-noise threshold, 4; relative intensity threshold, 0%; minimum intensity threshold, 100; peak width, 0.2 m/z; height, 80%; baseline subtraction, TopHat. The effect of acetylation yields an increase of 43 Da in the mass of ciprofloxacin and norfloxacin but not in levofloxacin (Figure 1). The acetylation reaction was thus measured by mass spectrometry. Only peaks belonging to the corresponding antibiotic drug and the respective acetylation products were

121 labeled. Since no automated data evaluation software was available at this time, the
122 classification of susceptible and resistant was done by visual inspection of the mass peaks in
123 the spectra. In order to achieve this, the peak intensities of the acetylated forms were
124 compared to the intensities of the non-acetylated forms. Isolates were classified as negative
125 for *AAC(6')-Ib-cr* if the intensity distributions of the antibiotic analyzed were similar to those
126 for the negative control. Isolates were classified as *AAC(6')-Ib-cr* positive if the intensities of
127 the acetylated forms represented 50% or more of the intensities compared to the non-
128 acetylated forms.

129

130 Results

131 **MS analysis of FQ with the isogenic *E. coli* control strains**

132 As a preliminary step to analyze the mass spectra of ciprofloxacin, norfloxacin and levofloxacin,
133 a collection of 81 previously studied isogenic *Escherichia coli* control strains (derived from *E.*
134 *coli* ATCC 25922) were used, as they represent a consistent and reliable model of measuring
135 the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme activity.

136 The MS spectrum corresponding to ciprofloxacin revealed the molecular ion peak $[M + H]^+$ at
137 332.3 Da, the corresponding sodium adduct $[M + Na]^+$ at 354.3 Da and the potassium adduct
138 $[M + K]^+$ at 370.3 Da (table 1). In contrast, the spectra of the supernatants obtained after 30
139 min of incubation of the *AAC(6')-Ib-cr*-producing isogenic *E. coli* control strains revealed the
140 appearance of three additional peaks corresponding to the acetylated molecular ion peaks, $[M$
141 $+ X + H]^+$ at 374.3 Da, and its corresponding adducts $[M + X + Na]^+$ at 396.3 Da and $[M + X + K]^+$
142 at 412.3 Da. Figure 2 shows representative spectra of the acetylated and non-acetylated forms
143 of ciprofloxacin.

144 The MS spectrum corresponding to norfloxacin revealed the molecular ion peak $[M + H]^+$ at
145 320.3 Da, the corresponding sodium adduct $[M + Na]^+$ at 342.3 Da and the potassium adduct
146 $[M + K]^+$ at 358.3 Da (table 1). In contrast, the spectra of the supernatants obtained after 30
147 min of incubation of the *AAC(6')-Ib-cr*-producing isogenic *E. coli* control strains revealed the
148 appearance of three additional peaks corresponding to the acetylated molecular ion peak $[M$
149 $+ X + H]^+$ at 362.3 Da, and its corresponding adducts $[M + X + Na]^+$ at 384.3 Da and $[M + X + K]^+$
150 at 400.3 Da. Figure 3 shows representative spectra of the acetylated and non-acetylated forms
151 of norfloxacin.

152 Following MS analysis, isolates 12 to 21 (supplementary material, table 1) carrying the *AAC(6')-*
153 *Ib-cr* resistant determinant showed enzymatic activity against both ciprofloxacin and
154 norfloxacin. The negative controls showed no activity against the antibiotics. Isolates carrying
155 other resistance mechanisms than the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme, did not alter the appearance of
156 the mass peaks described above, which remained unchanged regardless of how the
157 modification was conferred: either chromosomally mediated quinolone resistance
158 mechanisms (including modifications in *gyrA* and *parC* or *marR* deletion) or the plasmid-
159 mediated *Qnr*.

160 The MS spectrum corresponding to levofloxacin revealed the molecular ion peak $[M + H]^+$ at
161 362.3 Da, the corresponding sodium adduct $[M + Na]^+$ at 384.3 Da and the potassium adduct
162 $[M + K]^+$ at 400.3 Da (table 1). The spectra of the supernatants obtained after 30 min of
163 incubation of the *AAC(6')-Ib-cr*-producing isogenic *E. coli* control strains revealed no additional
164 peaks corresponding to the acetylated forms as expected.³ Figure 4 shows representative
165 spectra of levofloxacin.

166 The MS spectra of the FQ analysed identified the molecular ion peak as the most intense, with
167 the sodium adduct and the potassium adduct being less intense in turn. This was similar for the
168 corresponding acetylated forms of ciprofloxacin and norfloxacin, resulting in the potassium

adduct peak occasionally detected. A clear differentiation between *AAC(6')-Ib-cr*-producing isolates and non-producing was thus possible by comparing the observed peak patterns for the modified antibiotics, after an incubation time of 30 minutes. A shorter incubation time did not result in a clear differentiated peak pattern.

Identification of the *AAC(6')-Ib-cr*-positive clinical isolates

The MALDI-TOF-MS-based assay for the detection of acetylation of ciprofloxacin and norfloxacin and non-acetylation of levofloxacin was validated using a collection of 36 clinical isolates (supplementary material, table 2). In the case of *AAC(6')-Ib-cr*-producing isolates, the characteristic peak pattern, which was described above for the isogenic *E. coli* control strains, was also found. The intensities of the acetylated forms and the non-acetylated forms were found to be in the same range of magnitude within the same spectrum, with the *AAC(6')-Ib-cr*-producing isolates more similar to those of the positive controls. None of the isolates tested showed a total disappearance of the non-acetylated forms, with both acetylated and non-acetylated forms co-existing in the same spectrum. A prolonged incubation time with the respective antibiotics did not lead to detection of acetylated forms only. This bears out that the *AAC(6')-Ib-cr* acetyltransferase enzyme only confers a low level of resistance in agreement with the enzymatic kinetics and the MIC expressed by these isolates previously studied.^{3,6} Five out of the 11 isolates which had the *AAC(6')-Ib* enzyme with no resistance adaptation for modifying FQ showed no mass peaks belonging to the acetylated forms. The rest of the isolates showed very low intensity peaks for the acetylated form, of approximately 10 % of the intensities of the non-acetylated forms. Levofloxacin was found intact in all isolated tested, with no apparent modification of the chemical structure, as it was for the controls. The sensitivity and specificity of the MALDI-TOF-MS-based method described above were therefore 100% for a 30 min assay.

193

194 **Discussion**

195 MALDI-TOF-MS-based analysis of bacteria to determine their resistance/susceptibility against
196 β -lactam antibiotics has recently been successfully reported.¹⁵⁻²⁰ The measurements of small
197 molecules such as antibiotics by MALDI-TOF MS is a relatively new application of the
198 technology. Our data support that this approach is not only possible for β -lactam antibiotics,
199 but also for FQs and in the future possibly for other families of antibiotics.

200 Here, we describe the mass spectrometric analysis of the activity of the *AAC(6')-Ib-cr*
201 acetyltransferase plasmid-associated gene that encodes a variant of a common aminoglycoside
202 acetyltransferase that is capable of acetylating and reducing the activity of certain FQs, such as
203 ciprofloxacin and norfloxacin, but not levofloxacin. Although the degree of resistance
204 conferred is small, this mechanism has been shown to act additively with another resistance
205 mechanisms for FQs, and is associated with other types of resistance mechanisms such as
206 extended-spectrum β -lactamases.^{6,22}

207 In contrast to the molecular methods usually used to detect this type of resistance, the MALDI-
208 TOF-MS-based method described here delivers results after only 30 min.^{23,24} Another
209 advantage of this method is its relative affordability. It is also easy to develop, and within reach
210 for many clinical microbiology laboratories. Besides this, the interpretation of the spectra is
211 reasonably simple, once the assignment of mass peaks has been described and the procedure
212 may be automated, as it has been done for β -lactam antibiotics.²⁵

213 Following validation using a clinical cohort comprised of 36 clinical isolates, the sensitivity and
214 specificity of the MALDI-TOF MS assay for detection of *AAC(6')-Ib-cr*-enzyme carriers were
215 determined to be 100 %. Evaluation of the different antibiotics in this manner led us to
216 conclude that use of either ciprofloxacin or norfloxacin as a resistance marker using mass
217 spectrometry will lead to no differences. Although the MICs of norfloxacin are superior to
218 those of ciprofloxacin when the *AAC(6')-Ib-cr*-enzyme is present, we have not observed an

219 increased degree of acetylation during exposure to norfloxacin by mass spectrometry.^{3,6,22} A
220 future automation of the assay could come to clear answers in this field. Levofloxacin may be
221 useful as a negative control in such an assay.

222 Although the *AAC(6')-Ib-cr* acetyltransferase enzyme confers only a low level of resistance, well
223 below the cut-off for clinical resistance (either CLSI or EUCAST), the MALDI-TOF assay
224 described herein is able to detect it accurately with a 100 % agreement compared to molecular
225 techniques.

226 The presence of very low intensity acetylated peaks observed in isolates containing the
227 *AAC(6')-Ib* enzyme with no resistance adaptation for modifying FQs could indicate that a
228 residual acetylation of ciprofloxacin and norfloxacin is possible. However, this fact can not be
229 considered significant as these peaks had very low intensities compared to the ones
230 produced by the isolates containing *AAC(6')-Ib-cr*, and were thus easily distinguishable.
231 Besides, by employing the data evaluation algorithm proposed herein, these mass peaks would
232 not be even classified as *AAC(6')-Ib-cr* positive. No relationship between these isolates and the
233 level of expression could be detected in this manner. Furthermore, the presence of other
234 resistance mechanisms associated with FQR had no impact on the results obtained.

235 The concentrations of antibiotics used for the MALDI-TOF assay are much higher than the
236 concentrations used for the phenotypic assays,¹⁵ as lower antibiotic concentrations would lead
237 to poor quality spectra. However, this does not impact the results as isolates carrying the
238 *AAC(6')-Ib-cr*-enzyme would acetylate the substrate in any case, resulting in clearly different
239 spectra between the non-acetylated forms and the acetylated.

240 In conclusion, MALDI-TOF MS is an outstanding method for the detection of the *AAC(6')-Ib-cr*-
241 enzyme in clinical samples. The method is easy to perform and analytical results can be
242 obtained within 30 minutes. This novel application of MALDI-TOF MS broadens the potential of

243 this technology, expanding the capacity of MALDI-TOF MS analysis into new families of
244 antibiotics, in which resistance is promoted by enzymatic modification of the antibiotic.

245

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263 **Acknowledgements**

264 We thank Francisco Soria-Melguizo, S. A. Spain, for technical support.

265

266 **Funding**

267 This work was supported by the Fondo de Investigación Sanitaria (grant numbers PI15/00860
268 to GB and PI11-00934 to JMRRM) integrated in the Plan Nacional de I+D and funded by the
269 Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). We also thank the Spanish Network for Research in
270 Infectious Diseases (REIPI RD12/0015/0014 to GB), Subdirección General de Redes y Centros
271 de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad and co-financed by
272 European Development Regional Fund "A Way to achieve Europe" ERDF. M. Oviaño is
273 financially supported by the Río Hortega Programme of the ISCIII (CM15/00155).

274

275 **Transparency declarations**

276 None to declare.

277

278

279

280

281

282

283

284

285 **REFERENCES**

- 286 1. Hooper DC. Mechanisms of quinolone resistance. In: Hooper DC, Rubinstein E, editors.
 287 Quinolone antimicrobial agents. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press; 2003. p. 41–67.
 288 <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817817.chap3>
- 289 2. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC *et al*. Plasmid-mediated quinolone resistance: a
 290 multifaceted threat. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 664–89.
- 291 3. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA *et al*. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new
 292 adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med* 2006; **12**: 83–8.
- 293 4. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance.
 294 *Microbiol Spectr*. 2014; **2**: PLAS-0006-2013
- 295 5. Warburg G, Korem M, Robicsek A *et al*. Changes in AAC(6')-Ib-cr prevalence and
 296 fluoroquinolone resistance in nosocomial isolates of *Escherichia coli* collected from
 297 1991 through 2005. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1268–70.
- 298 6. Briaies A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C *et al*. Prevalence of plasmid-mediated
 299 quinolone resistance determinants *Qnr* and AAC(6')-Ib-cr in *Escherichia coli* and
 300 *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. *Int J*
 301 *Antimicrob Agents* 2012; **39**: 431–4.
- 302 7. Machuca J, Agüero J, Miró E *et al*. Prevalence of quinolone resistance mechanisms in
 303 Enterobacteriaceae producing acquired AmpC β -lactamases and/or carbapenemases
 304 in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016 [Epub ahead of print]
- 305 8. Abd El-Aziz NK, Gharib AA. Coexistence of plasmid-mediated quinolone resistance
 306 determinants and AmpC-Beta-Lactamases in *Escherichia coli* strains in Egypt. *Cell Mol*
 307 *Biol* 2015; **61**: 29–35.

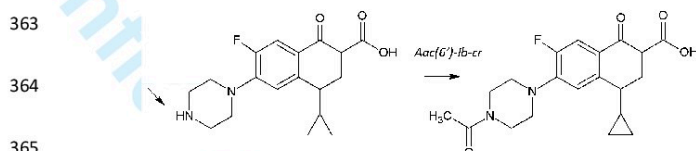
- 308 9. Fernández-Martínez M, Miró E, Ortega A *et al.* Molecular identification of
309 aminoglycoside-modifying enzymes in clinical isolates of *Escherichia coli* resistant to
310 amoxicillin/clavulanic acid isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2015; **46**: 157-63.
- 311 10. Hujer KM, Hujer AM, Endimiani A *et al.* Rapid determination of quinolone resistance in
312 *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1436-42.
- 313 11. El-Bouri K, Johnston S, Rees E *et al.* Comparison of bacterial identification by MALDI-
314 TOF mass spectrometry and conventional diagnostic microbiology methods:
315 agreement, speed and cost implications. *Br J Biomed Sci* 2012; **69**: 47-55.
- 316 12. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry tools for
317 bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem* 2011; **44**: 104-
318 9.
- 319 13. Barba MJ, Fernández A, Oviaño M *et al.* Evaluation of MALDI-TOF mass spectrometry
320 for identification of anaerobic bacteria. *Anaerobe* 2014; **30**: 126-8
- 321 14. Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A *et al.* Direct identification of pathogens
322 from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-
323 flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014; **20**: O421-7.
- 324 15. Spärbier K, Schubert S, Weller U *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time
325 of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance
326 against β -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 927-37
- 327 16. Jung J, Popp C, Spärbier K, *et al.* Evaluation of matrix-assisted laser desorption
328 ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance
329 in Enterobacteriaceae derived from blood cultures. *J Clin Microbiol* 2014; **52**: 924-30
- 330 17. Oviaño M, Fernández B, Fernández A *et al.* Rapid detection of Enterobacteriaceae
331 producing extended spectrum beta-lactamases directly from positive blood cultures

- 332 by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Clin*
333 *Microbiol Infect* 2014; **20**: 1146-57
- 334 18. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R *et al*. MALDI-TOF MS meropenem
335 hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for the direct detection of
336 carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 2015; **53**:1731-5
- 337 19. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G. Efficient Detection of Carbapenemase Activity
338 in Enterobacteriaceae by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight
339 Mass Spectrometry in less than 30 Minutes. *J Clin Microbiol* 2015; **53**:2163-71.
- 340 20. Oviaño M, Barba MJ, Fernández B *et al*. Rapid detection of OXA-48-producing
341 Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass
342 spectrometry (MALDI-TOF). *J Clin. Microbiol* 2015; **54**:754-9
- 343 21. Rodríguez-Martínez JM, Santiso R, Machuca J *et al*. Assessment of chromosomal DNA
344 fragmentation by quinolones in an isogenic collection of *Escherichia coli* with defined
345 resistance mechanisms. *Microb Drug Resist* 2016; **22**: 354-9.
- 346 22. Machuca J, Ortiz M, Recacha E *et al*. Impact of *AAC(6')-Ib-cr* in combination with
347 chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in *Escherichia*
348 *coli*. *J Antimicrob Chemother* 2016; [Epub ahead of print]
- 349 23. Jones-Dias D, Manageiro V, Graça R *et al*. *QnrS1* and *AAC(6')-Ib-cr*-Producing
350 *Escherichia coli* among isolates from animals of different sources: susceptibility and
351 genomic characterization. *Front Microbiol* 2016; **7**: 671.
- 352 24. Guillard T, Fontaine N, Limelette A *et al*. A simplified and cost-effective method
353 combining real-time PCR and pyrosequencing for detection of *AAC(6')-Ib-cr* gene. *J*
354 *Microbiol Methods* 2013; **95**: 268-71.

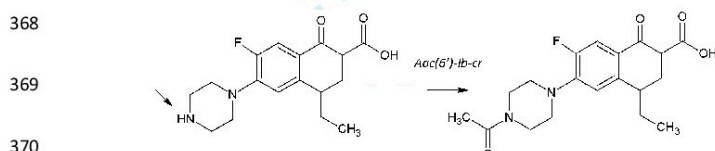
- 355 25.Oviaño M, Sparbier K, Barba MJ *et al.* Universal protocol for the rapid automated
356 detection of carbapenem resistant Gram-negative bacilli directly from blood cultures
357 by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry
358 (MALDI-TOF MS). *Int J Antimicrob Agents* 2016; [Epub ahead of print]
359

Figure 1. Effect of the *AAC(6')-Ib-cr* gene on the chemical structures of ciprofloxacin (A), norfloxacin (B) and levofloxacin (C).

A



B



C

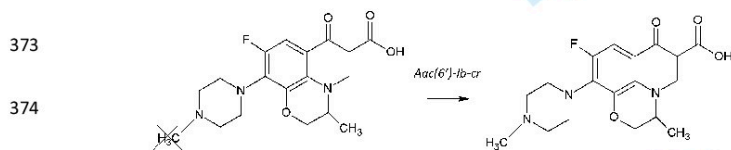


Fig. 1. Acetylation occurs at the amino nitrogen on the piperazinyl substituent of fluoroquinolones, a structural feature shared by ciprofloxacin and norfloxacin but not levofloxacin. Acetylation yields an increase of 43 Da in the mass of the antibiotic which can be measured by mass spectrometry.

Table 1. The molecular forms of each antibiotic with their corresponding masses defining the sensitivity and resistance patterns of ciprofloxacin, norfloxacin and levofloxacin associated with the *AAC(6')-Ib-cr* gene.

Antibiotic	Mol wt (g/mol)	Sensitivity pattern			Resistant pattern		
		$[M + H]^+$	$[M + Na]^+$	$[M + K]^+$	$[M + X^a + H]^+$	$[M + X + Na]^+$	$[M + X + K]^+$
Ciprofloxacin	331.3	332.3	354.3	370.3	374.3	396.3	412.3
Norfloxacin	319.3	320.3	342.3	358.3	362.3	384.3	400.3
Levofloxacin	361.3	362.3	384.3	400.3	- ^b	-	-

^aX, acetyl group incorporated by the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme

^b No acetylation occurs for levofloxacin in the presence of the *AAC(6')-Ib-cr* enzyme

Figure 2. MALDI-TOF MS spectra of ciprofloxacin.

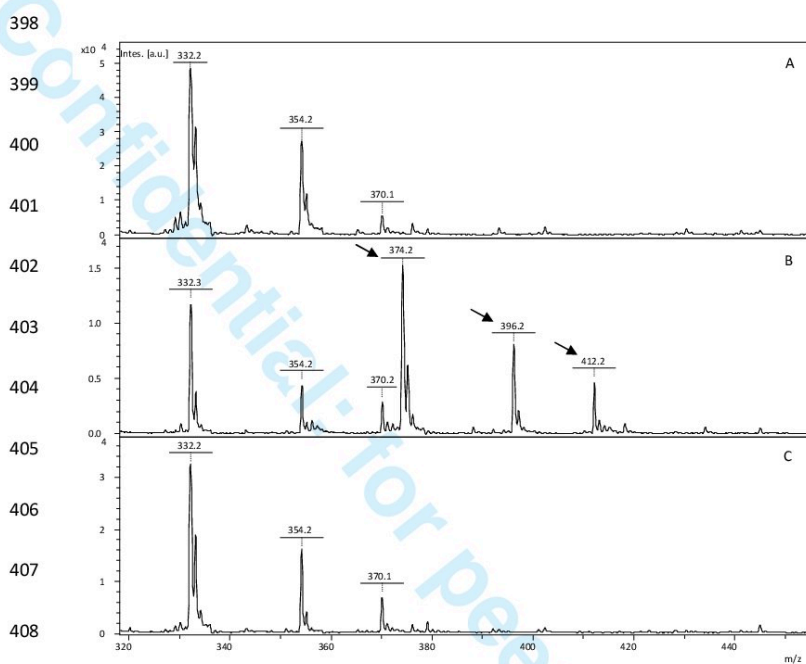
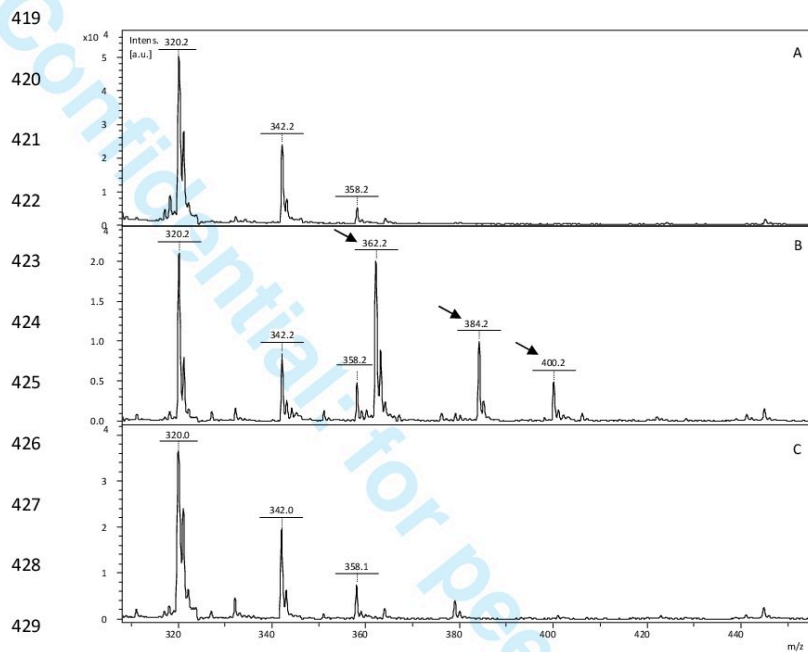


Fig. 2. MALDI-TOF MS spectra of ciprofloxacin after incubation with the negative control *E. coli* ATCC-25922 (A), an AAC(6')-Ib-cr enzyme producer (*E. coli*, isolate 21 supplementary material) (B) and a non AAC(6')-Ib-cr enzyme producer (*E. coli*, isolate 11 supplementary material) (C). Peaks corresponding to the acetylated form of ciprofloxacin are indicated with an arrow.

418 Figure 3. MALDI-TOF MS spectra of norfloxacin.



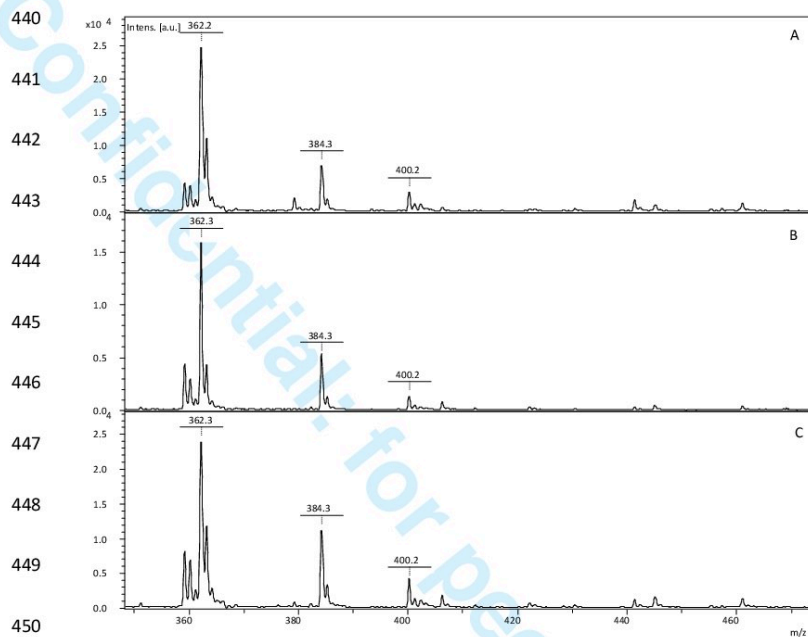
430

431 Fig. 3. MALDI-TOF MS spectra of norfloxacin after incubation with the negative control *E. coli*

432 ATCC-25922 (A), an AAC(6')-Ib-cr enzyme producer (*E. coli*, isolate 21 supplementary material)

433 (B) and a non AAC(6')-Ib-cr enzyme producer (*E. coli*, isolate 11 supplementary material) (C).

434 Peaks corresponding to the acetylated form of norfloxacin are indicated with an arrow.

439 **Figure 4.** MALDI-TOF MS spectra of levofloxacin.

452 **Fig. 4.** MALDI-TOF MS spectra of levofloxacin after incubation with the negative control *E. coli*
453 ATCC-25922 (A), an AAC(6')-Ib-cr enzyme producer (*E. coli*, isolate 21 supplementary material)
454 (B) and a non AAC(6')-Ib-cr enzyme producer (*E. coli*, isolate 11 supplementary material) (C).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table 1. Isogenic *E. coli* control strains derived from *E. coli* ATCC 25922 used in the study.

Strains	Molecular mechanism of quinolone resistance				
	<i>gyrA1</i>	<i>gyrA2</i>	<i>parC</i>	<i>marR</i>	PMQR
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	S83L	-	-	-	-
4	S83L	D87N	-	-	-
5	S83L	-	S80R	-	-
6	S83L	D87N	S80R	-	-
7	-	-	-	Δ	-
8	S83L	-	-	Δ	-
9	S83L	-	S80R	Δ	-
10	S83L	D87N	-	Δ	-
11	S83L	D87N	S80R	Δ	-
12	-	-	-	-	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
13	-	-	-	Δ	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
14	S83L	-	-	-	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
15	S83L	-	-	Δ	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
16	S83L	-	S80R	-	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
17	S83L	-	S80R	Δ	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
18	S83L	D87N	-	-	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
19	S83L	D87N	-	Δ	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
20	S83L	D87N	S80R	-	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
21	S83L	D87N	S80R	Δ	<i>pBK-AAC(6')-Ib-cr</i>
22	-	-	-	-	<i>pBK-QnrA</i>
23	-	-	-	-	<i>pBK-QnrB</i>
24	-	-	-	-	<i>pBK-QnrC</i>
25	-	-	-	-	<i>pBK-QnrD</i>
26	-	-	-	-	<i>pBK-QnrS</i>
27	S83L	-	-	-	<i>pBK-QnrA</i>
28	S83L	-	-	-	<i>pBK-QnrB</i>
29	S83L	-	-	-	<i>pBK-QnrC</i>
30	S83L	-	-	-	<i>pBK-QnrD</i>
31	S83L	-	-	-	<i>pBK-QnrS</i>
32	S83L	D87N	-	-	<i>pBK-QnrA</i>
33	S83L	D87N	-	-	<i>pBK-QnrB</i>
34	S83L	D87N	-	-	<i>pBK-QnrC</i>
35	S83L	D87N	-	-	<i>pBK-QnrD</i>
36	S83L	D87N	-	-	<i>pBK-QnrS</i>
37	S83L	-	S80R	-	<i>pBK-QnrA</i>
38	S83L	-	S80R	-	<i>pBK-QnrB</i>
39	S83L	-	S80R	-	<i>pBK-QnrC</i>
40	S83L	-	S80R	-	<i>pBK-QnrD</i>
41	S83L	-	S80R	-	<i>pBK-QnrS</i>

42	S83L	D87N	S80R	-	<i>pBK-QnrA</i>
43	S83L	D87N	S80R	-	<i>pBK-QnrB</i>
44	S83L	D87N	S80R	-	<i>pBK-QnrC</i>
45	S83L	D87N	S80R	-	<i>pBK-QnrD</i>
46	S83L	D87N	S80R	-	<i>pBK-QnrS</i>
47	-	-	-	Δ	<i>pBK-QnrA</i>
48	-	-	-	Δ	<i>pBK-QnrB</i>
49	-	-	-	Δ	<i>pBK-QnrC</i>
50	-	-	-	Δ	<i>pBK-QnrD</i>
51	-	-	-	Δ	<i>pBK-QnrS</i>
52	S83L	-	-	Δ	<i>pBK-QnrA</i>
53	S83L	-	-	Δ	<i>pBK-QnrB</i>
54	S83L	-	-	Δ	<i>pBK-QnrC</i>
55	S83L	-	-	Δ	<i>pBK-QnrD</i>
56	S83L	-	-	Δ	<i>pBK-QnrS</i>
57	S83L	D87N	-	Δ	<i>pBK-QnrA</i>
58	S83L	D87N	-	Δ	<i>pBK-QnrB</i>
59	S83L	D87N	-	Δ	<i>pBK-QnrC</i>
60	S83L	D87N	-	Δ	<i>pBK-QnrD</i>
61	S83L	D87N	-	Δ	<i>pBK-QnrS</i>
62	S83L	-	S80R	Δ	<i>pBK-QnrA</i>
63	S83L	-	S80R	Δ	<i>pBK-QnrB</i>
64	S83L	-	S80R	Δ	<i>pBK-QnrC</i>
65	S83L	-	S80R	Δ	<i>pBK-QnrD</i>
66	S83L	-	S80R	Δ	<i>pBK-QnrS</i>
67	S83L	D87N	S80R	Δ	<i>pBK-QnrA</i>
68	S83L	D87N	S80R	Δ	<i>pBK-QnrB</i>
69	S83L	D87N	S80R	Δ	<i>pBK-QnrC</i>
70	S83L	D87N	S80R	Δ	<i>pBK-QnrD</i>
71	S83L	D87N	S80R	Δ	<i>pBK-QnrS</i>
72	-	-	-	-	<i>pBK-qepA</i>
73	S83L	-	-	-	<i>pBK-qepA</i>
74	S83L	D87N	-	-	<i>pBK-qepA</i>
75	S83L	-	S80R	-	<i>pBK-qepA</i>
76	S83L	D87N	S80R	-	<i>pBK-qepA</i>
77	-	-	-	Δ	<i>pBK-qepA</i>
78	S83L	-	-	Δ	<i>pBK-qepA</i>
79	S83L	D87N	-	Δ	<i>pBK-qepA</i>
80	S83L	-	S80R	Δ	<i>pBK-qepA</i>
81	S83L	D87N	S80R	-	<i>pBK-qepA</i>

Table 2. Clinical isolates used in the study for validation of the MALDI-TOF MS acetylation assay.

Strain number	Isolate	Molecular mechanism of quinolone resistance		
		<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	PMQR
1	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
2	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
3	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
4	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
5	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
6	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
7	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R	AAC(6')-Ib-wt
8	<i>E. coli</i>	-	-	AAC(6')-Ib-wt
9	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
10	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
11	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
12	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
13	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
14	<i>E. coli</i>	S83L/D87N	S80R/E84V	AAC(6')-Ib-cr
15	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	AAC(6')-Ib-wt
16	<i>K. pneumoniae</i>	S83F	-	AAC(6')-Ib-wt
17	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	QnrA/ AAC(6')-Ib-wt
18	<i>K. pneumoniae</i>	S83I	-	AAC(6')-Ib-cr
19	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	AAC(6')-Ib-cr
20	<i>K. pneumoniae</i>	D87N	-	AAC(6')-Ib-cr
21	<i>K. pneumoniae</i>	S83L/D87N	E84K	AAC(6')-Ib-cr
22	<i>K. pneumoniae</i>	S83L/D87N	-	AAC(6')-Ib-cr
23	<i>K. pneumoniae</i>	S83L/D87N	S80I/E84V	AAC(6')-Ib-cr
24	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	AAC(6')-Ib-cr
25	<i>K. pneumoniae</i>	S83F/D87Y	-	AAC(6')-Ib-wt
26	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	QnrB/ AAC(6')-Ib-cr
27	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	AAC(6')-Ib-cr
28	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	AAC(6')-Ib-cr
29	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	AAC(6')-Ib-wt
30	<i>K. pneumoniae</i>	S83F/D87N	-	AAC(6')-Ib-wt
31	<i>K. pneumoniae</i>	S83I	S80I	AAC(6')-Ib-cr
32	<i>K. pneumoniae</i>	S83F/D87A	-	AAC(6')-Ib-wt
33	<i>K. pneumoniae</i>	S83Y	S80I	AAC(6')-Ib-cr
34	<i>K. pneumoniae</i>	D87G	-	QnrB/ AAC(6')-Ib-wt
35	<i>K. pneumoniae</i>	-	-	AAC(6')-Ib-cr
36	<i>K. pneumoniae</i>	S83Y	-	AAC(6')-Ib-wt

4. DISCUSIÓN

Se han explorado diversas estrategias para identificar resistencias antibióticas mediante MALDI-TOF MS. El problema fundamental, es que los mecanismos de resistencia a antibióticos en bacterias son muy variados, por lo que es difícil encontrar una solución universal. Una aproximación es la detección de la actividad enzimática responsable de la resistencia. Añadiendo el antibiótico a un extracto bacteriano fresco durante un tiempo adecuado y adaptando la lectura del equipo al antibiótico que vamos a seguir, podemos comprobar el efecto que produce la bacteria sobre el antibiótico y detectar los subproductos generados en la reacción enzimática, mediante un cambio de masas en el espectro.

En esta tesis hemos evaluado este método sobre antibióticos β -lactámicos, incluyendo carbapenémicos y fluoroquinolonas, con excelentes resultados, pudiendo detectar la resistencia en menos de 2 horas para todos los antibióticos utilizados y todos los mecanismos de resistencia estudiados. Esto convierte al MALDI-TOF MS en una técnica de primera línea para la determinación rápida de resistencias antimicrobianas.

Además en los distintos trabajos realizados hemos podido comprobar que esta técnica puede ser también aplicada sobre muestras directas como los hemocultivos, tanto para la determinación de β -lactamasas de espectro extendido, como de carbapenemasas. El impacto clínico de una técnica microbiológica rápida en el diagnóstico de una sepsis es de máxima relevancia, situando al MALDI-TOF MS como una técnica de gran influencia diagnóstica.

La sensibilidad y especificidad de la técnica para la determinación de resistencias es cercana al 100 % en todas las aproximaciones metodológicas estudiadas y además presentan una completa correlación con los métodos moleculares.

La interpretación de los espectros de masas se ha realizado de dos formas a lo largo de los distintos trabajos. Por un lado se ha realizado una interpretación visual de los espectros de masas, observando la aparición y desaparición de los picos de masas correspondientes al antibiótico y la generación de subproductos con nuevas masas, correspondientes a la acción enzimática sobre el antibiótico. El otro modelo para la interpretación de los espectros es el uso de un software automatizado, el MALDI-TOF

Biotyper Compass software en el módulo Selective Testing of Antibiotic Resistance STAR-BL (Bruker Daltonik). Este software ha representado un gran adelanto sobre el método cualitativo utilizado en los primeros trabajos. El establecimiento de una relación de hidrólisis, llamado logRQ, permite la cuantificación de la hidrólisis en relación con la actividad enzimática. Esto permite reducir la variabilidad intra- e interobservador, proporcionando resultados estandarizados en los distintos laboratorios en los que se aplique esta técnica.

Las principales limitaciones de la detección de la resistencia mediante MALDI-TOF MS a través del ensayo funcional, es la determinación de mecanismos de resistencia que son exclusivamente mediados por enzimas de resistencia modificantes del antibiótico, por lo que el perfil de aplicación no es universal. Además la determinación de la resistencia es dirigida, por lo que para obtener un antibiograma completo, necesitaríamos examinar cada antibiótico por separado. En el futuro, junto con la interpretación automatizada de los espectros, vendrá la incubación robótica, la generación de placas con antibióticos incorporadas para realizar un antibiograma a la carta, etc. Medidas encaminadas a simplificar el proceso, universalizarlo y automatizarlo. Otra de las limitaciones principales de esta metodología es que el modo de adquisición de los espectros de los antibióticos es diferente del utilizado para la identificación bacteriana, por lo que necesitaríamos cambiar el método de análisis y calibrarlo de nuevo, cada vez que pasáramos de identificación bacteriana a detección de resistencias. En el nuevo software automatizado (MBT Compass Software en el módulo STAR-BL) de Bruker Daltonik, esto se hace automáticamente en el equipo, siendo tan sólo necesario que cada tarjeta de lectura lleve incorporado un pocillo de calibración para cada uno de los métodos. Dado el volumen de identificaciones microbiológicas realizadas en los laboratorios de rutina mediante MALDI-TOF MS, la incorporación de la detección de resistencias conlleva una reorganización de la dinámica de trabajo diaria, para priorizar las determinaciones más relevantes para el diagnóstico microbiológico. Posiblemente en el futuro, la incorporación de más de un equipo MALDI-TOF MS en los laboratorios clínicos de microbiología se convierta en algo habitual.

4.1. DISCUSIÓN CAPÍTULO 1

En este trabajo demostramos que es posible la detección de β -lactamasas directamente del hemocultivo positivo mediante MALDI-TOF MS, utilizando la cefotaxima y la ceftazidima como antibióticos marcadores de la resistencia y el ácido clavulánico, para confirmar la presencia de BLEE. El tiempo global del ensayo es de unas dos horas, teniendo en cuenta la extracción bacteriana, la incubación y la detección en el equipo. El ensayo demuestra su gran utilidad clínica, teniendo en cuenta que se adelanta a los métodos convencionales utilizados en el laboratorio, entre 24 y 48 horas.

Se observó una relación cualitativa entre la CMI y el grado de hidrólisis del antibiótico. En rasgos generales cuanto mayor es la CMI del aislado frente al antibiótico, mayor es el grado de hidrólisis, por lo que la detección temprana del antibiótico se relacionó con CMIs más altas.

También se confirmó la utilidad del ácido clavulánico para asociar la hidrólisis del β -lactámico con el mecanismo de resistencia de tipo BLEE. Se comprobó que se producía una total inhibición de la hidrólisis del antibiótico cuando se añadía ácido clavulánico al medio de reacción en los aislados portadores de enzimas de tipo BLEE, mientras que en los portadores de AmpC este efecto desaparecía, observándose una hidrólisis clara del antibiótico en presencia o ausencia del inhibidor.

Evaluando la reactividad y posterior detección de los antibióticos cefotaxima y ceftazidima en EM, la ceftazidima resultó un antibiótico marcador con tiempos de detección más largos y con un mayor número de falsos negativos. Por lo que la sensibilidad del método no se ve realmente mejorada con la adición de ceftazidima. Además la mayor parte de los aislados son enzimas de tipo CTX-M cuya eficacia hidrolítica por la cefotaxima es mayor. Los únicos casos en los que puede resultar útil recurrir a un segundo antibiótico es en los casos de aislados productores de enzimas de AmpC, como CMY-2 en los que un tiempo de incubación de dos horas con ceftazidima puede generar mejores resultados que con cefotaxima.

La tecnología MALDI-TOF MS tiene una sensibilidad del 99% y una especificidad del 100 % para detectar aislados productores de BLEE desde el hemocultivo positivo. Por tanto es una técnica muy útil desde el punto de vista clínico, ya que permite adecuar la terapia

antibiótica empírica de forma temprana, y que posee la ventaja de proporcionar resultados rápidos, con sensibilidades similares a los métodos moleculares, siendo además un método barato, una vez hecho el desembolso inicial en la tecnología.

4.2. DISCUSIÓN CAPÍTULO 2

El método MALDI-TOF MS para la determinación de resistencias a antibióticos carbapénemicos, utilizando como antibióticos marcadores el ertapenem y la temocilina ha demostrado ser una excelente herramienta permitiendo no sólo la detección sino la clasificación de las distintas carbapenemasas en sus correspondientes clases de Ambler y además ha demostrado excelentes resultados sobre las enzimas de tipo OXA-48, que permanecían indetectables por la mayoría de métodos fenotípicos.

El ensayo ha demostrado una sensibilidad del 100 % para la detección de todas las familias de carbapenemasas, excepto para las de IMP, en las que la sensibilidad es del 87%. Los dos aislados que no pudieron ser detectados eran dos *E. cloacae* portadores de la enzima IMP-22. Además de ser la familia con una sensibilidad más baja, las enzimas de tipo IMP son las que presentaron un tiempo medio de detección más alto, 80 min, frente a las VIM que tan sólo necesitaron 30 min para conseguir una hidrólisis efectiva.

La ventaja principal del método es para las enzimas de tipo OXA-48, que además de rapidez (60 min) presenta una alta sensibilidad (100%) frente a la encontrada en otros test como el Carba NP test (≈80%). La sensibilidad y el tiempo de reacción del test para estas enzimas está realmente mejorada frente a otros ensayos de detección previos con el MALDI-TOF MS, a través de la adición al buffer de reacción de bicarbonato de amonio, que favorece la reactividad de las OXA-48 y el SDS que ayuda en la lisis de bacterias especialmente mucosas. Además, la posibilidad de utilizar un test de 15 min de incubación para la hidrólisis de temocilina, como marcador de este grupo, permite en áreas con gran prevalencia de aislados productores de enzimas de tipo OXA-48 el uso exclusivo un test con ertapenem y temocilina con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 93 %.

Los resultados obtenidos con el MALDI-TOF MS en comparación con los obtenidos mediante el método de disco-difusión con los inhibidores, presenta varias ventajas. La

principal es que los resultados se obtienen entre 16 y 24 horas antes. Además mientras que para la clase A y D de Ambler las sensibilidades son comparables, para la clase B la sensibilidad del método MALDI-TOF MS es del 96% mientras que para el disco-difusión es del 80%.

El ensayo también fue probado y validado sobre 8 hemocultivos genotípicamente caracterizados como *K. pneumoniae bla_{OXA-48}* obtenidos de pacientes bacteriémicos durante un brote en el Complejo Hospitalario Universitario A Coruña, mostrando un patrón inconfundible de OXA-48.

Proponemos que en áreas donde la enzima OXA-48 tenga una alta prevalencia se evalúe el ertapenem y la temocilina a 60 y 15 min respectivamente. En áreas donde la prevalencia no sea tan alta o lo sea de otro tipo de carbapenemasas, sugerimos evaluar el ertapenem junto con los inhibidores de reacción a 90 min y la especificidad del método alcanzará el 100%.

4.3. DISCUSIÓN CAPÍTULO 3

La detección de bacterias productoras de carbapenemasas directamente del hemocultivo positivo con un método universal para bacilos Gram negativos es una gran ventaja de la tecnología MALDI-TOF MS. En este trabajo describimos un método automatizado para la detección de la actividad carbapenemasa tanto sobre el aislamiento obtenido tras el cultivo en placa hasta el hemocultivo positivo, en un ensayo utilizando el imipenem como antibiótico marcador.

El buffer de reacción ha demostrado ser vital en el ensayo para la detección de la actividad carbapenemasa, ya que dependiendo del medio de reacción, los resultados pueden ir desde falsos negativos a observarse una alta reactividad enzimática. El bicarbonato de amonio a pH=8, ha demostrado ser el medio en el que se encuentran los mejores resultados, especialmente para las enzimas de tipo OXA-48. La inclusión del SDS en el medio de reacción fue imprescindible para conseguir una hidrólisis adecuada en *A. baumannii*.

Para obtener una máxima viabilidad de la actividad enzimática bacteriana, resultó esencial el uso de 100 µl de reactivo de lisis (Sepsityper Kit) en la extracción bacteriana desde el hemocultivo, ya que cantidades más altas, como las usadas en el protocolo convencional de identificación son demasiado agresivas para la funcionalidad de la enzima.

Hasta el momento, todos los protocolos que se habían desarrollado para la identificación de carbapenemasas en hemocultivos, necesitaban un tiempo de incubación de al menos 4 horas, y algunos hasta un día para obtener resultados positivos, especialmente para las bacterias productoras de OXA-48 y para *A. baumannii*. En este trabajo probamos que la detección es posible en 30 min con las condiciones anteriormente descritas. Además, el tiempo total de realización de la técnica no supera 1 hora teniendo en cuenta, la extracción del hemocultivo y la lectura en el equipo.

El impacto clínico de este estudio no sólo reside en la capacidad de este ensayo de utilizar una única metodología para detectar carbapenemasas en bacilos Gram negativos con gran rapidez, sino también en la posibilidad de utilizar un software automatizado (MBT Compass software en el módulo STAR-BL) para la interpretación de los espectros de masas, proporcionando un resultado de sensibilidad o resistencia del aislado, sin necesidad de que la lectura tenga que ser realizada por un experto en EM. Además este software permite no sólo la determinación de resistencias a antibióticos β -lactámicos, sino también la identificación del aislado. Esta es una ventaja que no la proporciona ningún método molecular o fenotípico. Si además de esto, le añadimos que la sensibilidad y especificidad es comparable a los métodos moleculares y que la técnica es mucho más barata y de fácil manejo, la detección de carbapenemasas mediante MALDI-TOF MS con el método descrito lo convierte en un método de gran aplicación en los laboratorios de microbiología clínica como una técnica rápida de primera línea.

4.4. DISCUSIÓN CAPÍTULO 4

En este trabajo proponemos un nuevo método basado en el ensayo funcional de detección de β -lactamasas mediante MALDI-TOF MS para detectar la actividad

carbapenemasa en *Enterobacteriaceae* y *A. baumannii* utilizando el imipenem como antibiótico marcador y el avibactam como un inhibidor de clase A y D de Ambler.

La evaluación de la actividad de la combinación de imipenem-avibactam (IMI-AVI) frente a aislados productores de carbapenemasas, demuestra por primera vez su uso prometedor en EM como un nuevo método rápido para la detección de *Enterobacteriaceae* productoras de KPC y OXA-48. Además si combinamos este ensayo junto con el análisis de la hidrólisis de temocilina, los aislados de tipo OXA-48 podrían identificarse con un 100% de sensibilidad y especificidad. El avibactam no consiguió inhibir de manera clara la actividad carbapenemasa de ninguno de los *A. baumannii*, estableciéndose un patrón inconsistente en la hidrólisis del imipenem.

Este ensayo tiene grandes ventajas ya que permite la detección y clasificación de carbapenemasas en 30 min con gran fiabilidad. Además, el análisis detallado de los espectros ya no es necesario, lo cual simplifica el ensayo y permite su aplicación por parte de personal no entrenado en EM. Estas características lo convierten en un método coste-efectivo para su implementación en los laboratorios de microbiología clínica.

Nuestros datos apoyarían fuertemente el uso de la combinación imipenem-avibactam en un régimen terapéutico futuro, ya que el avibactam mejora la actividad del imipenem en los aislados productores de carbapenemasas en *Enterobacteriaceae*. En el futuro, el MALDI-TOF MS podrá ser usado como una herramienta prometedora para evaluar la actividad de los inhibidores de β -lactamasas, correlacionando los resultados de logRQ con la CMI del antibiótico y abriendo una nueva vía para investigar combinaciones efectivas de antibiótico β -lactámico con inhibidor de β -lactamasa.

4.5. DISCUSIÓN CAPÍTULO 5

El análisis mediante MALDI-TOF MS para determinar la susceptibilidad o resistencia bacteriana a antibióticos β -lactámicos ha sido validada ya con resultados satisfactorios. La medida de moléculas pequeñas como los antibióticos es una nueva aplicación en desarrollo del MALDI-TOF MS. Nuestros datos apoyan que esta aproximación no es sólo posible para antibióticos β -lactámicos, sino también para las fluoroquinolonas y en el futuro quizás para otras familias de antibióticos.

En este ensayo demostramos la capacidad del MALDI-TOF MS para detectar la actividad de la enzima acetiltransferasa AAC(6')-Ib-cr en *Enterobacteriaceae*, evaluando su actividad sobre ciprofloxacino y norfloxacino y utilizando el levofloxacino como control negativo. Aunque el grado de resistencia es bajo, el MALDI-TOF MS ha probado que detecta con una sensibilidad y especificidad del 100 % este mecanismo de resistencia.

De forma opuesta a los métodos moleculares que son los utilizados para determinar este tipo de resistencia, el MALDI-TOF MS proporciona resultados en 30 min. Otra ventaja de este método es su coste, más accesible que los métodos moleculares. Es además fácil de realizar, y al alcance de cualquier laboratorio de microbiología. Además, la interpretación de los espectros es razonablemente fácil una vez que se han asignados los picos de masas correspondientes al compuesto y a su forma acetilada. Además, debemos de tener también en cuenta, que en el futuro es posible la automatización de la interpretación como ya se ha hecho para los antibióticos β -lactámicos.

La evaluación de diferentes antibióticos nos permitió concluir que el uso de ciprofloxacino sobre norfloxacino o viceversa como marcadores de resistencia en EM no conlleva ninguna diferencia apreciable. Aunque las CMI's sobre norfloxacino son superiores a las de ciprofloxacino cuando la enzima AAC(6')-Ib-cr está presente, no hemos observado un incremento en la intensidad de la acetilación de norfloxacino sobre ciprofloxacino mediante EM.

Las concentraciones utilizadas en el MALDI-TOF MS son mucho mayores que las utilizadas en los ensayos fenotípicos, ya que concentraciones más bajas conllevarían una peor calidad espectral. Sin embargo, este hecho no afecta los resultados, ya que los aislados portadores de la enzima AAC(6')-Ib-cr acetilarán el sustrato en cualquier caso, resultando en una diferenciación clara entre la forma no acetilada y la acetilada.

El método MALDI-TOF MS es por tanto un método prometedor en la detección de la enzima AAC(6')-Ib-cr en muestras clínicas. Esta nueva aplicación expande el potencial evolutivo de la tecnología MALDI-TOF MS por primera vez a otras familias de antibióticos no β -lactámicos.

5. CONCLUSIONES

5.1. CONCLUSIONES CAPÍTULO 1

- I. Es posible la detección de BLEE directamente de hemocultivos positivos en 1 hora mediante MALDI-TOF MS.
- II. La cefotaxima es un antibiótico marcador más sensible y más rápido que la ceftazidima para la detección de BLEE mediante MALDI-TOF MS.
- III. El empleo del ácido clavulánico sirve para confirmar la presencia de aislados portadores de BLEE frente a AmpC.
- IV. Se observa una relación cualitativa entre la CMI y el grado de hidrólisis del antibiótico.

5.2. CONCLUSIONES CAPÍTULO 2

- I. La utilización de ertapenem más los inhibidores ácido borónico y ácido dipicolínico permite la detección de carbapenemasas y su clasificación en las clases A, B y D de Ambler en 90 min mediante MALDI-TOF MS.
- II. La utilización de un test de 60 min con ertapenem y 15 min con temocilina permite la identificación de carbapenemasas de tipo OXA-48 con una sensibilidad del 100 % y una especificidad del 93 %.

5.3. CONCLUSIONES CAPÍTULO 3

- I. Es posible el desarrollo de un método universal para la detección de carbapenemasas en bacilos Gram negativos mediante MALDI-TOF MS.
- II. El empleo de imipenem 0.5 mg/ml en 10mM NH_4CO_3 , ZnCl_2 10 μg /ml y 0.005% SDS pH=8, permite la detección de carbapenemasas en bacilos Gram negativos en 30 min.
- III. El método puede aplicarse tanto a colonias aisladas en cultivo como a hemocultivos positivos.
- IV. El desarrollo de un programa automatizado permite la cuantificación del grado de hidrólisis del antibiótico (logRQ) y el informe del estado de susceptibilidad del

aislado sin necesidad de una interpretación visual en función del espectro de masas del antibiótico.

5.4. CONCLUSIONES CAPÍTULO 4

- I. El uso de la combinación imipenem-avibactam permite la detección de carbapenemasas de tipo KPC y OXA-48 mediante MALDI-TOF MS en un ensayo de 30 min con un 100% de sensibilidad y especificidad.
- II. La inhibición del avibactam sobre las carbapenemasas de tipo OXA-48 es total.
- III. El comportamiento del avibactam sobre las OXAs de *A. baumannii* es errático, no pudiéndose considerarse un inhibidor efectivo.

5.5. CONCLUSIONES CAPÍTULO 5

- I. Es posible la detección de aislados portadores del determinante de resistencia mediado por plásmidos AAC(6')-Ib-cr sobre ciprofloxacino y norfloxacino mediante MALDI-TOF MS en 30 min.
- II. Los aislados portadores del determinante de resistencia AAC(6')-Ib-cr acetilan las fluoroquinolonas aumentando la masa del antibiótico en 43 Da.
- III. Los aislados fueron clasificados como portadores del determinante de resistencia AAC(6')-Ib-cr cuando la intensidad de las formas acetiladas es de al menos un 50 % o superior respecto a las formas no acetiladas.
- IV. No se produjo la desaparición de los picos de masas correspondientes a las formas no acetiladas en ninguno de los casos, de acuerdo con el bajo nivel de resistencia proporcionado con esta enzima.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pulido MR, García-Quintanilla M, Martín-Peña R *et al.* Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2710-7.
2. Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1415-8.
3. Okumura LM, Riveros BS, Gomes-da-Silva MM *et al.* A cost-effectiveness analysis of two different antimicrobial stewardship programs. *Braz J Infect Dis.* 2016; 20:255-61.
4. Trenholme GM, Kaplan RL, Karakusis PH *et al.* Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1342-5.
5. Iregui M, Ward S, Sherman G *et al.* Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2002; 122: 262-8.
6. Luna CM, Aruj P, Niederman MS *et al.* Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2006; 27: 158-64.
7. Dryden M, Johnson AP, Ashiru-Oredope D *et al.* Using antibiotics responsibly: right drug, right time, right dose, right duration. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2441-3.
8. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.
9. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
10. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Rapid detection of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3016-22.
11. Dortet L, Brechard L, Poirel L, *et al.* Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using an updated version of the carba NP test. *J Med Microbiol* 2014; 63:772-6.

12. Tijet N, Boyd D, Patel SN *et al.* Evaluation of the carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 4578–80.
13. Chong P, McCorrister S, Unger M *et al.* MALDI-TOF MS detection of carbapenemase activity in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* 438 compared against the Carba-NP assay. *J Microbiol Methods* 2015; 111:21-3.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 25th informational supplement. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standard Institute; 2015. CLSI document m100-s25.
15. Poirel L, Nordmann P. Rapidec carba NP test for rapid detection of carbapenemase producers. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 3003–8.
16. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 4281–3.
17. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM *et al.* Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19:165–256.
18. Bou G, Chaves F, Oliver A *et al.* Métodos microbiológicos para la vigilancia del estado de portador de bacterias multirresistentes. 55. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2015.
19. Spanu T, Fiori B, D’Inzeo T, *et al.* Evaluation of the new Nuclisens EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (*bla_{KPC}*). *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2783–5.
20. Nijhuis R, van Zwet A, Stuart JC *et al.* Rapid molecular detection of extended spectrum β -lactamase gene variants with a novel ligation-mediated real-time PCR. *J Med Microbiol* 2012; 61:1563–7.
21. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P *et al.* Probe ligation and real-time detection of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76(4):502–5.

22. Huang TD, Bogaerts P, Ghilani E *et al.* Multicentre evaluation of the check-direct CPE assay for direct screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from rectal swabs. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70: 1669–73.
23. Lafeuille E, Laouira S, Sougakoff W *et al.* Detection of OXA-48-like carbapenemase genes by the Xpert carba-r test: Room for improvement. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 45: 441–2.
24. Oviaño M, Torres I, González M *et al.* Evaluation of a novel procedure for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) using the LightMix® modular carbapenemase kits. *J Antimicrob Chemother.* 2016. [en prensa]
25. Cohen Stuart J, Dierikx C, Al Naiemi N *et al.* Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* using ligation-mediated amplification with microarray analysis. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1377–81.
26. Peter H, Berggrav K, Thomas P *et al.* Direct detection and genotyping of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases from urine by use of a new ADN microarray test. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 3990–8.
27. Bogaerts P, Hamels S, de Mendonca R *et al.* Analytical validation of a novel high multiplexing real-time PCR array for the identification of key pathogens causative of bacterial ventilator-associated pneumonia and their associated resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; 68: 340–7.
28. Endimiani A, Hujer AM, Hujer KM, *et al.* Evaluation of a commercial microarray system for detection of SHV-, TEM-, CTX-M-, and KPC-type β -lactamase genes in gram-negative isolates. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2618–22.
29. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P *et al.* Evaluation of a ADN microarray (check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1608–13.
30. Batchelor M, Hopkins KL, Liebana E *et al.* Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 440–51.

31. Mancini N, Infurnari L, Ghidoli N *et al.* Potential impact of a microarray-based nucleic acid assay for rapid detection of gram-negative bacteria and resistance markers in positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 1242–5.
32. Sullivan KV, Deburger B, Roundtree SS *et al.* Rapid detection of inpatient gramnegative bacteremia; extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemase resistance determinants with the Verigene BC-GN test: a multi-center evaluation. *J Clin Microbiol* 2014; 52:2416–21.
33. Snitkin ES, Zelazny A, Gupta J *et al.* Genomic insights into the fate of colistin resistance and *Acinetobacter baumannii* during patient treatment. *Genome Res* 2013; 23: 1155-62
34. Tan SY, Chua SL, Liu Y *et al.* Comparative genomic analysis of rapid evolution of an extreme-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clone. *Genome Biol Evol* 2013; 5: 807–18.
35. Zankari E, Hasman H, Kaas RS *et al.* Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:771–7.
36. Mingorance J, Regueiro B, Muñoz-Bellido JL. Perspectiva histórica de la espectrometría de masas en microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34(Supl 2):3-7
37. Fenn JB. Electrospray ionization mass spectrometry: how it all began. *J Biomol Tech* 2002; 13:101-18.
38. Tanaka K, Waki H, Ido Y *et al.* Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988; 2:151-3.
39. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988; 60:2299-301.
40. Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V *et al.* The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 1996; 14: 1584-6.
41. Krishnamurthy T, Ross PL. Rapid identification of bacteria by direct matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996; 10:1992-6.

42. Holland RD, Wilkes JG, Rafii F *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1996; 10:1227-32.
43. Seng P, Drancourt M, Scola B *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; 49:543-51.
44. Ferreira L, Vega S, Sánchez-Juanes F *et al.* Identificación bacteriana mediante espectrometría de masas matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight. Comparación con la metodología habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28: 492-7.
45. Lévesque S, Dufresne PJ, Soualhié H *et al.* A side by side comparison of Bruker Biotyper and VITEK MS: utility of MALDI-TOF MS technology for microorganism identification in a public health reference laboratory. *PLoS One* 2015; 10: e0144878.
46. Marklein G, Josten M, Klanke U *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47:2912-7.
47. Bizzini A, Durussel C, Bille J *et al.* Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 1549-54.
48. Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Ruiz A *et al.* Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3.0 for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2016; 54:1144-7.
49. Hoyos-Mallecot Y, Miranda-Casas C, Cabrera-Alvargonzalez JJ *et al.* Identificación bacteriana directamente del hemocultivo mediante una técnica rápida de espectrometría de masas Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time-of-Flight. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31:152-5.
50. Schulthess B, Brodner K, Bloemberg GV *et al.* Identification of Gram-positive cocci by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: comparison of different preparation methods and

- implementation of a practical algorithm for routine diagnostics. J Clin Microbiol 2013; 51:1834-40.
51. Nonnemann B, Tvede M, Bjarnsholt T. Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry. APMIS 2013; 121:871-7.
 52. Werno AM, Christner M, Anderson TP *et al.* Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from non-pneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012; 50: 2863-7.
 53. Arinto-Garcia R, Pinho MD, Carriço JA *et al.* Comparing Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and phenotypic and molecular methods for identification of species within the *Streptococcus anginosus* group. J Clin Microbiol 2015; 53: 3580-8.
 54. March-Rosselló GA, Muñoz-Moreno MF, García-Loygorri-Jordán de Urriés MC *et al.* A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2013; 32:699- 704.
 55. Romero-Gómez MP, Gómez-Gil R, Paño-Pardo JR *et al.* Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective. J Infect 2012; 65:513-20.
 56. Biswas S, Rolain JM. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture. J Microbiol Methods 2013; 92:14-24.
 57. Drevinek M, Dresler J, Klimentova J *et al.* Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. Lett Appl Microbiol 2012; 55: 40-6.
 58. Lista F, Reubsaet FA, De Santis R *et al.* Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. BMC Microbiol 2011; 11:267.
 59. Mesureur J, Ranaldi S, Monnin V *et al.* A simple and safe protocol for preparing *Brucella* samples for MALDI-TOF MS analysis. J Clin Microbiol 2016; 54:449-52

60. Kok J, Thomas LC, Olma T *et al.* Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization SepsityperTM and time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2011; 6: e23285.
61. Rodríguez JC, Bratos MA, Merino E *et al.* Utilización de MALDI-TOF en el diagnóstico rápido de la sepsis. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34: 19-25
62. Rodríguez-Sánchez B, Ruiz-Serrano MJ, Ruiz A *et al.* Evaluation of MALDI Biotyper Mycobacteria Library v3.0 for Identification of Nontuberculous Mycobacteria. *J Clin Microbiol* 2016; 54:1144-7.
63. Becker PT, de Bel A, Martiny D *et al.* Identification of filamentous fungi isolates by MALDI-TOF mass spectrometry: clinical evaluation of an extended reference spectra library. *Med Mycol* 2014; 52: 826-34.
64. Lau AF, Drake SK, Calhoun LB *et al.* Development of a clinically comprehensive database and a simple procedure for identification of molds from solid media by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 828-34
65. Rodríguez-Sánchez B, Sánchez-Carrillo C, Ruiz A *et al.* Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2014 Jul; 20: 421-7.
66. Sánchez-Juanes F, Siller Ruiz M, Moreno Obregón F *et al.* Pretreatment of urine samples with SDS improves direct identification of urinary tract pathogens with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 335-8.
67. Mahé P, Arsac M, Chatellier S *et al.* Automatic identification of mixed bacterial species fingerprints in a MALDI-TOF mass spectrum. *Bioinformatics* 2014; 30: 1280-6.
68. Wang MC, Lin WH, Yan JJ *et al.* Early identification of microorganisms in blood culture prior to the detection of a positive signal in the BACTEC FX system using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *J Microbiol Immunol Infect* 2015; 48: 419-24.
69. Clerc O, Prod'hom G, Vogne C *et al.* Impact of matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of

- patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. Clin Infect Dis 2013; 56: 1101-7.
70. Béraud G, Garcia M, Rahbari-Oskoui FF. Impact of MALDI-TOF will be highly dependent on the clinician. Clin Infect Dis 2013; 57: 1501-2.
 71. Huang AM, Newton D, Kunapuli A *et al.* Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. Clin Infect Dis 2013; 57: 1237-45.
 72. Perez KK, Olsen RJ, Musick WL *et al.* Integrating rapid pathogen identification and antimicrobial stewardship significantly decreases hospital costs. Arch Pathol Lab Med 2013; 137: 1247-54.
 73. Culebrasa E, Álvarez-Buylla A, Artacho-Reinoso MJ *et al.* Estudios de tipificación con MALDI-TOF. Enferm Infecc Microbiol Clin 2016; 34:42-6
 74. Gherardi G, Creti R, Pompilio A *et al.* An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. Diagn Microbiol Infect Dis 2015; 81:219-26.
 75. Turton JF, Turton SE, Yearwood L *et al.* Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect 2010; 16:1111-6.
 76. Pourcel C, Minandri F, Hauck Y *et al.* Identification of variable-number tandem-repeat (VNTR) sequences in *Acinetobacter baumannii* and interlaboratory validation of an optimized multiple-locus VNTR analysis typing scheme. J Clin Microbiol 2011; 49:539-48.
 77. Novais A, Sousa C, De Dios Caballero J *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33: 1391-9.
 78. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M *et al.* Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 and ST405 clonal groups by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2014; 52:1034-40.

79. Sachse S, Bresan S, Erhard M *et al.* Comparison of multilocus sequence typing, RAPD, and MALDI-TOF mass spectrometry for typing of beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 80:267-71.
80. Bernaschi P, Del Chierico F, Petrucca A *et al.* Microbial tracking of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital setting. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2013; 26:463-72.
81. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M *et al.* Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One* 2013; 8:e61428.
82. Leuschner RG, Beresford-Jones N, Robinson C. Difference and consensus of whole cell *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars matrix-assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry spectra. *Lett Appl Microbiol* 2004; 38:24-31.
83. Dieckmann R, Malorny B. Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77:4136-46.
84. Kuhns M, Zautner AE, Rabsch W *et al.* Rapid discrimination of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* from other serovars by MALDI TOF mass spectrometry. *PLoS One* 2012;7:e40004
85. Khennouchi NC, Loucif L, Bouteftouchet N *et al.* MALDI-TOF MS as a tool to detect a nosocomial outbreak of extended spectrum β -lactamase- and armA methyltransferase-producing *Enterobacter cloacae* clinical isolates in Algeria. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 6477-83.
86. Batah R, Loucif L, Olaitan AO *et al.* Outbreak of *Serratia marcescens* Coproducing ArmA and CTX-M-15 Mediated High Levels of Resistance to Aminoglycoside and Extended-Spectrum Beta-Lactamases, Algeria. *Microb Drug Resist* 2015; 21:470-6.
87. Mencacci A, Monari C, Leli C *et al.* Typing of nosocomial outbreaks of *Acinetobacter baumannii* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51:603-6.

88. Mulet M, Gomila M, Scotta C *et al.* Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. *Syst Appl Microbiol* 2012; 35:455-64
89. Josten M, Reif M, Szekat C *et al.* Analysis of the matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrum of *Staphylococcus aureus* identifies mutations that allow differentiation of the main clonal lineages. *J Clin Microbiol* 2013; 51:1809-17.
90. Lasch P, Fleige C, Stammler M *et al.* Insufficient discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus aureus* isolates. *J Microbiol Methods* 2014; 100:58-69.
91. Wolters M, Rohde H, Maier T *et al.* MALDITOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol* 2011; 301:64-8.
92. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance. World Health Organization. 2014.
[<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>]
93. National action plan for combating antibiotic resistant bacteria. The White House. 2015.
https://www.whitehouse.gov/sites/default/files/docs/national_action_plan_for_combating_antibiotic-resistant_bacteria.pdf
94. Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de la resistencia a los antibióticos. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Ministerio de Sanidad, servicios sociales e igualdad. Gobierno de España. 2014. <https://www.aemps.gob.es/publicaciones/publica/plan-estrategico-antibioticos/v2/docs/plan-estrategico-antimicrobianos-AEMPS.pdf>
95. Bradford PA. Extended-spectrum betalactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933–51.
96. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76

97. Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F *et al.* Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en Gram negativos. 38. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2011.
98. Curiao T, Morosini MI, Ruíz-Garbajosa P *et al.* Emergence of *bla*_{KPC-3}-Tn4401a associated with a *pKPN3/4*-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. J Antimicrob Chemother 2010; 65:1608–14
99. Tórtola MT, Lavilla S, Miró E *et al.* First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two Enterobacteriaceae isolates in Spain. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3492–4.
100. Lee CR, Lee JH, Park KS *et al.* Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. Front Microbiol 2016; 7:895.
101. Evans BA, Amyes SG. OXA β -lactamases. Clin Microbiol Rev 2014; 27: 241-63.
102. Galani I, Anagnostoulis G, Chatzikonstantinou M *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-48, CTX-M-15, and ArmA in Greece. Clin Microbiol Infect 2016; 22: 898-899.
103. Hooper DC. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases, and anti-topoisomerase resistance. Clin Infect Dis 1998; 27: S54–63.
104. Drlica K, Malik M, Kerns RJ *et al.* Quinolone-mediated bacterial death. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 385–92.
105. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. Lancet 1998; 351: 797–9.
106. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat clinical. Microbiol Rev 2009; 22: 664–89.
107. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA *et al.* Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. Nat Med 2006; 12: 83-8.
108. Warburg G, Korem M, Robicsek A *et al.* Changes in *AAC(6')-Ib-cr* prevalence and fluoroquinolone resistance in nosocomial isolates of *Escherichia*

- coli* collected from 1991 through 2005. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 1268-70.
109. Biales A, Rodríguez-Martínez JM, Velasco C *et al*. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *Qnr* and *AAC(6')-Ib-cr* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. Int J Antimicrob Agents 2012; 39: 431-4.
 110. Machuca J, Agüero J, Miró E *et al*. Prevalence of quinolone resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* producing acquired AmpC β -lactamases and/or carbapenemases in Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin 2016 [Epub ahead of print]
 111. Abd El-Aziz NK, Gharib AA. Coexistence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and AmpC-Beta-Lactamases in *Escherichia coli* strains in Egypt. Cell Mol Biol 2015; 61: 29-35.
 112. Sparbier K, Schubert S, Weller U *et al*. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against β -lactam antibiotics. J Clin Microbiol 2012; 50:927-37
 113. Jung JS, Popp C, Sparbier K *et al*. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. J Clin Microbiol 2014; 52:924-30
 114. Hrabák J, Walková R, Studentová V *et al*. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2011; 49:3222-7
 115. Horneffer V, Strupat K, Hillenkamp F. Localization of noncovalent complexes in MALDI-preparations by CLSM. J Am Soc Mass Spectrom 2006; 17:1599-604.

116. Hrabák J, Studentová V, Walková R *et al.* Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2441-3
117. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *J Clin Microbiol* 2015; 53:1731-5.
118. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3321-4.
119. Johansson A, Ekelöf J, Giske CG *et al.* The detection and verification of carbapenemases using ertapenem and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight. *BMC Microbiol* 2014; 10: 14:89.
120. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C *et al.* Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One* 2012; 7:e31676.
121. Sauget M, Cabrol N, Manzoni M *et al.* Rapid, sensitive and specific detection of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Microbiol Methods* 2014; 105:88-91
122. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G *et al.* Efficient detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 2015; 53: 2163-71.
123. Monteferrante CG, Sultan S, Ten Kate MT *et al.* Evaluation of different pretreatment protocols to detect accurately clinical carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF. *J Antimicrob Chemother* 2016 [en prensa]

124. Hooff GP, Van Kampen JJ, Meesters RJ *et al.* Characterization of β -lactamase enzyme activity in bacterial lysates using MALDI-mass spectrometry. *J Proteome Res* 2012;11:79-84
125. Bou G, Vila J, Seral C *et al.* Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in various scenarios and health settings. *Enfer. Infecc. Microbiol. Clin* 2014; 32: 24-32
126. Zimmermann S, Pauker V, Bode K, *et al.* Detecting aminoglycoside resistance by mass spectrometry. ECCMID, 2013 Abril 27-30; Berlin, Alemania; Poster P-1549.
127. Edwards-Jones V, Claydon MA, Evason DJ *et al.* Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2000; 49: 295-300.
128. Du Z, Yang R, Guo Z *et al.* Identification of *Staphylococcus aureus* and determination of its methicillin resistance by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* 2002; 74: 5487–91.
129. Bernardo K, Pakulat N, Macht M *et al.* Identification and discrimination of *Staphylococcus aureus* strains using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. *Proteomics* 2002; 2:747–53.
130. Lu JJ, Tsai FJ, Ho CM *et al.* Peptide biomarker discovery for identification of methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains by MALDI-TOF. *Anal Chem* 2012; 84: 5685–92.
131. Szabados F, Kaase M, Anders A *et al.* Identical MALDI TOF MS-derived peak profiles in a pair of isogenic SCCmec-harboring and SCCmec-lacking strains of *Staphylococcus aureus*. *J Infect* 2012; 65: 400-5.
132. Josten M, Dischinger J, Szekat C *et al.* Identification of agr-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring the class A mec complex by MALDI-TOF mass spectrometry. *Int J Med Microbiol* 2014; 304: 1018-23.

133. Rhoads DD, Wang H, Karichu J *et al.* The presence of a single MALDI-TOF mass spectral peak predicts methicillin resistance in staphylococci. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016 [en prensa]
134. Griffin PM, Price GR, Schooneveldt JM *et al.* Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry To Identify Vancomycin-Resistant *Enterococci* and Investigate the Epidemiology of an Outbreak. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2918–31.
135. Nakano S, Matsumura Y, Kato K *et al.* Differentiation of vanA-positive *Enterococcus faecium* from vanA-negative *E. faecium* by matrix-assisted laserdesorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2014; 44: 256–9.
136. Wybo A, De Bel O, Soetens F *et al.* Differentiation of cfiA-negative and cfiA-positive *Bacteroides fragilis* isolates by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 1961–4.
137. Nagy E, Becker S, Sóki J *et al.* Differentiation of division I (cfiA-negative) and division II (cfiA-positive) *Bacteroides fragilis* strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Med Microbiol* 2011; 60: 1584–90.
138. Johansson A, Nagy E, Sóki J. Instant screening and verification of carbapenemase activity in *Bacteroides fragilis* in positive blood culture, using matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology* 2014; 63: 1105–10.
139. Camara J, Hays F. Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2007; 389:1633–8.
140. Schaumann R, Knoop N, Genzel GH *et al.* A step towards the discrimination of beta-lactamase-producing clinical isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* by MALDI-TOF mass spectrometry. *Med Sci Monit* 2012; 18: MT71–7.

141. Papagiannitsis CC, Kotsakis SD, Tuma Z *et al.* Identification of CMY-2-Type Cephalosporinases in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* by MALDI-TOF MS. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; 58: 2952–57.
142. Cai JC, Hu YY, Zhang R *et al.* Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella spp.* by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2179–82.
143. Lange C, Schubert S, Jung J *et al.* Quantitative matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 4155-62.
144. Jung JS, Hamacher C, Gross B *et al.* Evaluation of a semi-quantitative MALDI-TOF MS method for rapid antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2016 [en prensa]
145. Marinach C, Alanio A, Palous M *et al.* MALDI-TOF MS-based drug susceptibility testing of pathogens: the example of *Candida albicans* and fluconazole. *Proteomics* 2009; 9: 4627-31.
146. De Carolis E, Vella A, Florio AR *et al.* Use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for caspofungin susceptibility testing of *Candida* and *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2012 ; 50: 2479-83
147. Vella A, De Carolis E, Vaccaro L *et al.* Rapid antifungal susceptibility testing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry analysis. *J Clin Microbiol* 2013; 51: 2964-9.
148. Saracli MA, Fothergill AW, Sutton DA *et al.* Detection of triazole resistance among *Candida species* by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol* 2015; 53: 736-42.